



# Mise en évidence des voies de transfert des cyanotoxines dans les lacs péri-alpins et implications dans les réponses physiologiques des poissons exposés

Benoît Sotton

## ► To cite this version:

Benoît Sotton. Mise en évidence des voies de transfert des cyanotoxines dans les lacs péri-alpins et implications dans les réponses physiologiques des poissons exposés. Sciences agricoles. Université de Grenoble, 2012. Français. NNT : 2012GRENA043 . tel-00808634

**HAL Id: tel-00808634**

**<https://theses.hal.science/tel-00808634>**

Submitted on 5 Apr 2013

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

## DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : Biodiversité, Ecologie, Environnement

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

**Benoît SOTTON**

Thèse dirigée par **Isabelle DOMAIZON** et  
codirigée par **Orlane ANNEVILLE** et **Jean GUILLARD**

préparée au sein du **Laboratoire INRA-UMR 0042 CARTEL**  
dans **l'École Doctorale Sciences et Ingénierie des systèmes, de  
l'environnement et des organisations**

## Mise en évidence des voies de transfert des cyanotoxines dans les lacs péri- alpins et implications dans les réponses physiologiques des poissons exposés

Thèse soutenue publiquement le **18 décembre 2012**  
devant le jury composé de :

**LATOUR Delphine** (LMGE, Clermont-Ferrand)

Rapporteur

**KESTEMONT Patrick** (FUNDP, Namur)

Rapporteur

**HUMBERT Jean-François** (ENS, Paris)

Examineur

**CATTANEO Franck** (HEPIA, Jussy)

Examineur

**DESVILETTES Christian** (LMGE, Clermont-Ferrand)

Examineur

**DOMAIZON Isabelle** (INRA, Thonon-les-bains)

Directeur de thèse

**ANNEVILLE Orlane** (INRA, Thonon-les-bains)

Co-directeur

**GUILLARD Jean** (INRA, Thonon-les-bains)

Co-directeur



## Remerciements

Mes plus profonds et sincères remerciements vont à mes trois directeurs de thèse **Isabelle Domaizon**, **Orlane Anneville** et **Jean Guillard** qui tout au long de ces trois années ont su m'écouter, me conseiller, m'orienter, me faire confiance, me soutenir et ceci toujours dans la décontraction et la bonne humeur. Croyez moi, je ne pouvais rêver d'un encadrement aussi parfait, tant dans son dynamisme et sa rapidité d'action que dans son humanité. C'est à vos côtés que la recherche est devenue pour moi, plus qu'une activité professionnelle banale, une passion. Il me faudrait probablement plus d'une autre thèse pour vous exprimer tous mes remerciements et ma gratitude envers vous et c'est avec un énorme pincement au cœur que je suis contraint de vous quitter. Il y a des jours où je me dis que j'aurais réellement dû prendre plus de vacances pour pouvoir réaliser ma thèse en plus de trois ans et rester quelques années de plus à travailler avec vous.

Je tiens également à remercier tout particulièrement les membres de mon jury, **Delphine Latour**, **Patrick Kestemont**, **Jean-François Humbert**, **Franck Cattaneo** et **Christian Desvilletes** pour avoir accepté de lire et juger mon travail.

Un grand merci également à l'ancien directeur d'unité **Jean-Marcel Dorioz** et au nouveau, **Bernard Montuelle**, pour m'avoir accueilli et permis de réaliser mon travail de thèse dans les meilleures conditions au sein de la station d'hydrobiologie lacustre de l'INRA.

Je remercie également **Alain Devaux**, **Sylvie Bony**, **Sophie Kryz**, **Sabrina Cadel-six**, **Hélène Huet** et **Olga Savichtcheva** pour leur collaboration efficace tant dans l'acquisition et l'analyse des données que dans la rédaction et la correction des différents articles.

Un immense merci à **Nicolas Givaudan** et à **Marjorie Maréchal** pour leur participation technique et intellectuelle à ce travail. Je ne vous remercierai jamais assez pour la patience, la gentillesse, le dévouement et le sérieux dont vous avez fait preuve au cours des différents travaux réalisés ensemble. Nico, c'est à tes cotés que les gavages, « l'heure du schlack » et la dissection des « Super-varouilles », sont devenus des activités scientifiques récréatives et ceci malgré les contraintes horaires. Merci encore.

Je tiens également à remercier chaleureusement **Michel Colon**, **Jean-Christophe Hustache**, **Pascal Chifflet** et **Pascal Perney** avec lesquels les heures de terrain et d'HPLC ont été un réel plaisir à partager. C'est en grande partie grâce à votre travail que ce travail de thèse a été possible.

Mes remerciements vont également à toutes les autres personnes du laboratoire qui de près ou de loin, scientifiquement ou humainement ont participé à la bonne réalisation de ce travail et notamment **Agnès Bouchez**, **Arnaud Caudron**, **Alexis Champigneulle**, **Cécile Chardon**, **Eric Delalex**, **Laurent Espinat**, **Christian Gillet**, **Valérie Hamelet**, **Aurélié Hebert**, **Stephan Jacquet**, **Danielle Lacroix**, **Marie-Elodie Perga**, **Frédérique Rimet**, et **Séverine Ruffier**.

Un grand merci également à tous mes compagnons de thèse, de formation et d'apéro, **Benjamin**

**Alric, Lyria Berdjeb, Nicolas Bernes, Vincent Berthon, Sophie Chambord, Vera Georgescu, Jordi Gil, Justine Guillochon, Nicolas Guyard, Sylvain Guyot, Onur Kerimoglu, Lenaïg Kermarrec, Florianne Larras, Thomas Pollet, Thomas Poulain, Alexandre Richard, Clément Villar et Xu Zhong** avec lesquels au cours de ces trois ans j'ai pu avoir des discussions scientifiques intéressantes, échanger des éclats de rire inoubliables et partager des instants musicaux improvisés.

Je tiens également à remercier **Alexandre Bec, Delphine Latour** (pour son rôle de superviseure de stage) et **Hélène Masclaux**, pour m'avoir ouvert les portes de la recherche et m'avoir permis de réaliser à leurs côtés et dans les meilleures conditions, mes stages universitaires.

Je n'oublie pas également **Stephane Fraisse, Matthieu Durand** et **Eric Pignol** pour les innombrables discussions scientifiques et philosophiques passionnantes, les fous rires toujours aux rendez-vous, les « apéros-skype » bénéfiques au moral et les nombreuses nuits à refaire le monde. Messieurs, c'est en partie grâce à vous que j'en suis arrivé là aujourd'hui. Merci également à **Yau, Stephano, Clouf, Blande, Maldo, Sarah, Adrien, les sœurs fufu, Meli, Benj, Marianne, Marie, Arnaud, Mag, Mel, Humphrey, Anthony, Manu, Gaelle, Jess, Loïc et tous les autres** avec qui j'ai pu passer également de très bons moments.

Qu'aurais-je pu faire sans **une famille** comme la mienne qui m'a soutenu tant financièrement que moralement au cours de ces longues années d'études. Merci à vous d'avoir su m'épauler et d'avoir su faire face à mes humeurs parfois massacrantes. Enfin, merci à toi **Anne-Joa**, de m'avoir apporté amour, joie, stabilité et réconfort mais aussi et surtout de m'avoir secoué quand j'en avais besoin.



## Résumé/Abstract

En dépit de la ré-oligotrophisation de nombreux lacs d'Europe du nord au cours des deux dernières décennies, les développements massifs de cyanobactéries toxiques, telle que *Planktothrix rubescens*, adaptée aux écosystèmes mésotrophes, sont encore largement observés. Parmi les cyanotoxines produites par cette espèce, les microcystines (MCs) sont les toxines les plus fréquemment rencontrées et sont reconnues comme des molécules perturbatrices de tous les compartiments trophiques des écosystèmes lacustres. Ces blooms toxiques affectent notamment les lacs péri-alpins pour lesquels des risques de contamination des populations piscicoles exploitées ont été démontrés. Cependant, il existe encore un manque de connaissances important tant concernant les voies de transfert de ces toxines au sein des réseaux trophiques limniques, que leurs effets physiologiques sur les populations de poisson. Dans le cadre de ce travail de thèse, deux modèles de poissons, dont les répartitions spatiales verticales diffèrent (juvéniles de perche et corégones), ont été considérés. Les objectifs principaux ont été traités d'une part au travers d'une approche expérimentale (par gavage) visant à analyser les processus d'accumulation et de détoxification, ainsi que les effets génotoxiques des MCs sur ces deux espèces modèles. Les réponses physiologiques ainsi étudiées ont permis de mettre en évidence que les juvéniles de perche et de corégone sont capables de détoxifier une partie des MCs ingérées, mais cependant des effets génotoxiques sont observés suite à l'exposition des poissons aux MCs. D'autre part, des approches écosystémiques ont permis (1) d'explorer les effets potentiels de la présence du bloom sur la répartition spatiale des poissons (2) d'évaluer les niveaux de contamination par les MCs pour les deux espèces de poisson en tenant compte de la variabilité saisonnière (3) d'identifier les principaux vecteurs zooplanctoniques de MCs jusqu'aux poissons.

Les résultats acquis montrent que les filaments de *P. rubescens* constituent une ressource alimentaire en période de bloom pour les organismes zooplanctoniques brouteurs et qu'un transfert de MCs est possible jusqu'aux espèces zooplanctoniques prédatrices et *in fine* jusqu'aux poissons. Nos résultats mettent également en avant que les voies de contamination ainsi que les intensités de contamination des poissons peuvent varier aussi bien à l'échelle saisonnière que journalière. Ces variations sont expliquées à la fois par les changements de régime alimentaire des poissons, les variations journalières de la production de MCs par *P. rubescens*, et les abondances et distributions verticales des différentes proies zooplanctoniques. A l'issue de ce travail, la part importante du transfert trophique des MCs jusqu'aux poissons a été vérifiée dans les cas des contaminations chroniques qui caractérisent les conditions de blooms des lacs péri-alpins (concentrations en cyanobactéries et en toxines modérées à fortes au cours de plusieurs mois).

Many deep peri-alpine lakes which are currently under re-oligotrophication are impacted by *Planktothrix rubescens* blooms. Among cyanotoxins produced by *P. rubescens*, microcystins (MCs) are the most commonly studied and are involved in many ecological disturbances. In peri-alpine lakes, these blooms might affect exploited fish species due to toxin contaminations. However, there is still a lack of knowledge regarding both transfer pathways of the toxin and their physiological effects on fish populations. In this work, two models of fish populations were considered (Young-Of-Year (YOY) perch and whitefish which exhibit distinct vertical distributions). The main objectives were on the one hand investigated through an experimental approach to analyze on the two model species, accumulation and detoxification processes as well as genotoxic effects of MCs. From these experiments, we showed that YOY perch and whitefish were able to detoxify part of the MCs but that genotoxic effects were still observed. On the other hand, ecosystemic approaches allowed (1) to explore the potential effects of the presence of bloom on the spatial distribution of fish, (2) to assess the levels of contamination by MCs for both fish species taking into account the seasonal variability, (3) to identify the main zooplanktonic vectors of MCs to fish.

Our results revealed that the filaments of *P. rubescens* are a food resource for zooplankton grazers, and that a trophic transfer of MCs exists from herbivorous to their zooplanktonic predators and *in fine* to fish. Our results also highlight that the contamination pathways and their intensities could vary both at seasonal and daily scales. These variations are explained by both changes in fish diet, daily variations in the production of MCs by *P. rubescens*, and abundances and vertical distributions of zooplanktonic preys. Overall, we highlighted the importance of MCs trophic transfer in fish intoxication in the case of chronic contaminations observed in peri-alpine lakes (moderate to severe cyanobacteria/toxins concentrations over several months).

## Liste des publications et contribution personnelle

1. Sotton, B., O. Anneville, S. Cadel-Six, I. Domaizon, S. Krys, and J. Guillard. 2011. Spatial match between *Planktothrix rubescens* and whitefish in a mesotrophic peri-alpine lake: Evidence of toxins accumulation. *Harmful Algae* 10: 749–758, doi:10.1016/j.hal.2011.06.006

Contribution: Participation à l'échantillonnage terrain, analyses des données concernant *P. rubescens* et les MCs, rédaction et correction de l'article.

2. Sotton, B., A. Devaux, N. Givaudan, J. Guillard, I. Domaizon, S. Bony, and O. Anneville. 2012. Short-term uptake of microcystin-LR by *Coregonus lavaretus*: GST activity and genotoxicity. *Ecotoxicology* 21: 1788–96, doi:10.1007/s10646-012-0913-4

Contribution: Design expérimental, réalisation des expériences, analyses des toxines et de la GST, analyses et interprétation des données, rédaction et correction de l'article.

3. Sotton, B., J. Guillard, S. Bony, A. Devaux, I. Domaizon, N. Givaudan, F. Crespeau, H. Huet and O. Anneville. 2012. Impact of toxic cyanobacterial blooms on Eurasian perch (*Perca fluviatilis*): experimental study and in situ observations in a peri-alpine lake. *PLoS ONE*. 7(12) : e52243

Contribution: Design expérimental, réalisation des expériences, analyses des toxines et de la GST, analyses et interprétation des données, rédaction et correction de l'article.

4. Sotton, B., J. Guillard, M. Maréchal, O. Savichtcheva, O. Anneville and I. Domaizon. 2012. In situ trophic transfer of microcystin throughout the pelagic food web: evidence of the role of zooplanktonic vectors in fish contamination. *Limnology & Oceanography*. Submitted

Contribution: Réflexion et mise en place de la stratégie d'échantillonnage, réalisation des prélèvements de terrain, analyses des échantillons zooplanctoniques et piscicoles (contenus stomacaux, comptage du zooplancton, analyses des toxines), analyses et interprétation des données récoltées, rédaction et correction de l'article.

## Liste des figures

Figure 1 : Diversité morphologique des cyanobactéries (d'après Palinska, 2008). Unicellulaires: (a) cellules uniques de *Cyanothece* PCC 7418, (b) colonies régulières de *Merismopedia punctata* and (c) colonies irrégulières de *Gloeotheca* PCC 6909. Filamenteuses, sans hétérocystes: (d) *Spirulina* sp., (e) *Arthrospira* sp., (f) *Planktothrix* sp. et (g) *Hydrocoleum cantharidosmum*. Filamenteuses avec hétérocystes: (h) *Aphanizomenon flos-aquae*, (i) *Scytonema* sp. and (j) *Stigonema* sp., cyanobactérie filamenteuse avec hétérocystes et trichomes branchés.

Figure 2 : Structure chimique de la cylindrospermopsine (d'après Falconer et Humpage, 2006).

Figure 3 : Structure chimique de la nodularine (d'après Chorus et Bartram, 1999). Z est un acide aminé variable, R est constitué par H ou CH<sub>3</sub>.

Figure 4 : Structure chimique de la microcystine (d'après Chorus et Bartram, 1999). Z et X sont des acides aminés variables, R est constitué par H ou CH<sub>3</sub>.

Figure 5 : Structure chimique de l'anatoxine-a (A), de l'homoanatoxine-a (B) et de l'anatoxine-a(s) (C) (d'après Chorus et Bartram, 1999).

Figure 6 : Structure chimique des saxitoxines. R est variable en fonction des variants (d'après Chorus et Bartram, 1999).

Figure 7 : Structure chimique de la  $\beta$ -N-méthylamino-L-alanine (BMAA) (d'après Jonasson et al., 2008).

Figure 8 : Structure chimique des lipopolysaccharides (LPS) (d'après Wiegand & Pflugmacher, 2005).

Figure 9 : Structure chimique de la lyngbyatoxine A (A), de la debromoaplysiatoxine (B) et de l'aplysiatoxine (C) (d'après Chorus et Bartram, 1999).

Figure 10 : Modèle hypothétique des effets toxiques induits par les microcystins (d'après Amado et Monserrat, 2010). MC: microcystines; GSH: glutathion; OATP: transporteurs membranaires d'acides biliaires; ROS: espèces réactives de l'oxygène; PK: protéines kinases; PP: protéines phosphatases; Prx-1 : peroxiredoxine; GCL: glutamate cystéine ligase; GST: glutathion-S-transferase; GPx: glutathion peroxydase; Nrf-2: facteur de transcription; ARE: Elément de réponse antioxydant

# Table des matières

<b>Remerciements .....</b>	<b>i</b>
<b>Résumé/Abstract .....</b>	<b>iii</b>
<b>Liste des publications et contribution personnelle .....</b>	<b>v</b>
<b>Liste des figures .....</b>	<b>vi</b>
<b>Table des matières.....</b>	<b>vii</b>
<b>Propos liminaires.....</b>	<b>ix</b>
<b>1 Préambule .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Les cyanobactéries: introduction générale .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Du passé au présent .....	1
1.1.2 Taxonomie.....	2
1.1.3 Organisation structurelle .....	2
1.1.4 Morphologie et reproduction.....	4
1.1.5 Avantages compétitifs des cyanobactéries.....	6
1.1.6 Impacts des blooms de cyanobactéries sur le fonctionnement et les usages des milieux.....	7
<b>1.2 Les toxines cyanobactériennes .....</b>	<b>8</b>
1.2.1 Les hépatotoxines .....	9
1.2.2 Les neurotoxines .....	13
1.2.3 Les dermatotoxines .....	15
<b>1.3 Les impacts des cyanobactéries et des microcystines sur le zooplancton et les poissons... 17</b>	<b>17</b>
1.3.1 Interactions cyanobactéries-zooplancton herbivore .....	17
1.3.2 Impacts des blooms de cyanobactéries et des microcystines sur les populations de poissons .....	22
<b>2 Chapitre introductif .....</b>	<b>34</b>
2.1 Occurrence de <i>Planktothrix rubescens</i> .....	34
2.2 <i>Planktothrix rubescens</i> : avantages compétitifs et toxicité.....	35
2.3 Effets de <i>P. rubescens</i> et des microcystines dans les écosystèmes lacustres .....	37
2.4 Contexte de l'étude et questionnement scientifique.....	40
<b>3 Effets de <i>P. rubescens</i> et des microcystines sur les populations de corégones (<i>C. lavaretus</i>) .....</b>	<b>43</b>
<b>3.1 Répartition spatiale saisonnière de <i>P. rubescens</i> et du corégone (<i>C. lavaretus</i>) dans le lac du Bourget : Implication dans l'accumulation des MCs. ....</b>	<b>43</b>
3.1.1 Contexte d'étude .....	43
3.1.2 Résumé de l'étude : .....	44
3.1.3 Article 1 .....	46
<b>3.2 Assimilation rapide de la MC-LR par le corégone : Activité de la GST et génotoxicité ...</b>	<b>56</b>
3.2.1 Contexte de l'étude.....	56
3.2.2 Résumé de l'étude .....	57
3.2.3 Article 2:.....	58

<b>4</b>	<b>Effets de <i>P. rubescens</i> et des microcystines sur les juvéniles de perche (<i>P. fluviatilis</i>)..</b>	<b>67</b>
<b>4.1</b>	<b>Détermination expérimentale et <i>in-situ</i> des effets d'un bloom de <i>P. rubescens</i> et des microcystines sur les juvéniles de perche.....</b>	<b>67</b>
4.1.1	Contexte de l'étude.....	67
4.1.2	Résumé de l'étude .....	68
4.1.3	Article 3.....	70
<b>5</b>	<b>Transfert trophique des microcystines dans les réseaux trophiques pélagiques.....</b>	<b>82</b>
<b>5.1</b>	<b>Rôle des organismes zooplanctoniques dans le transfert trophique jusqu'aux poissons...</b>	<b>82</b>
5.1.1	Contexte d'étude .....	82
5.1.2	Résumé de l'étude .....	83
5.1.3	Article 4.....	85
<b>6</b>	<b>Discussion générale .....</b>	<b>129</b>
<b>6.1</b>	<b>Le compartiment zooplanctonique comme vecteur de toxines : ingestion et transfert trophique des MCs.....</b>	<b>130</b>
<b>6.2</b>	<b>Facteurs impliqués dans la variabilité temporelle des transferts de toxines par le zooplancton .....</b>	<b>134</b>
6.1.1	Variabilité des transferts de MCs à l'échelle saisonnière .....	134
6.1.2	Variabilité des transferts de MCs à l'échelle journalière .....	135
<b>6.3</b>	<b>Importance des habitudes alimentaires des poissons et des processus de détoxification existants chez les espèces piscicoles cibles.....</b>	<b>138</b>
<b>6.4</b>	<b>La baignade, une autre voie de contamination pour les corégones et les juvéniles de perche ? .....</b>	<b>143</b>
<b>6.5</b>	<b>Vers l'estimation des risques liés à la contamination des juvéniles de perche et des corégones par les MCs : limites des données acquises et perspectives .....</b>	<b>145</b>
<b>7</b>	<b>Conclusion générale et perspectives .....</b>	<b>149</b>
<b>8</b>	<b>Abréviations .....</b>	<b>153</b>
<b>9</b>	<b>Références .....</b>	<b>155</b>

## Propos liminaires

Au cours du XX<sup>ème</sup> siècle, suite à l'eutrophisation exacerbée des milieux aquatiques, des développements massifs de cyanobactéries sont apparus partout dans le monde et dans tous les types de milieux (saumâtres, marins et dulçaquicoles). Les cyanobactéries sont alors devenues l'une des préoccupations environnementales et sanitaires majeures en raison de leur capacité à former des efflorescences et du caractère toxique de nombreux genres. Elles peuvent occasionner rapidement des désagréments tant d'un point de vue écologique qu'économique et sanitaire (utilisation des ressources aquatiques). Des mortalités massives de poissons, des empoisonnements causant la mort d'animaux sauvages et domestiques ainsi que d'humains, avérés à la suite d'efflorescence de cyanobactéries toxiques, ont accru l'intérêt du monde scientifique quant aux potentiels dangers que les cyanobactéries peuvent présenter pour les écosystèmes aquatiques et la santé humaine. Les études réalisées sur les causes d'apparitions des cyanobactéries dans les milieux aquatiques ainsi que le rôle de leurs toxines sur le fonctionnement et la structure des écosystèmes aquatiques n'ont cessé de s'accroître dans la littérature scientifique depuis la seconde partie du XX<sup>ème</sup> siècle jusqu'à nos jours. Cependant, compte tenu de la diversité spécifique des cyanobactéries, de la diversité des composés toxiques produits par ces organismes ainsi que de la complexité des interactions qui existent entre ces organismes et les autres compartiments biotiques, de nombreux efforts restent à faire afin d'évaluer au mieux leurs impacts potentiels sur la qualité et le fonctionnement des écosystèmes aquatiques touchés dont de nombreuses populations humaines dépendent. A ce jour, la quasi-totalité des cyanobactéries et des toxines étudiées sont responsables de désagréments parfois létaux sur les autres compartiments écosystémiques, tels que le phytoplancton, le zooplancton et la faune piscicole. Ainsi au cours des prochaines décennies, les efflorescences de cyanobactéries, dont l'occurrence et l'intensité sont susceptibles d'être favorisées par le réchauffement climatique global, pourraient bien être à l'origine d'autres perturbations écosystémiques encore inconnues mais également de maladies humaines émergentes (cancers, maladie neurodégénératives) (Cox et al. 2003; Pablo et al. 2009).

# 1 Préambule

## 1.1 Les cyanobactéries: introduction générale

### 1.1.1 Du passé au présent

Apparues sur Terre il y a près de 3.5 milliard d'années (Paerl et Paul, 2011), les cyanobactéries, organismes procaryotes photosynthétiques, sont les plus vieilles formes de vie connues à ce jour. Au cours du Précambrien, leur prolifération a joué un rôle essentiel dans la formation d'une atmosphère riche en oxygène et par conséquent, dans l'apparition et le développement des formes de vie complexes (Canfield, 2005).

Aujourd'hui encore, les cyanobactéries contribuent de manière directe et indirecte à l'économie et à la société (Chorus et Batram, 1999). En effet, elles participent de façon majeure à la production de biomasse phytoplanctonique de nombreux lacs et océans et ainsi au fonctionnement de leurs réseaux trophiques associés (Whitton et Potts, 2000). Elles sont responsables du maintien de la stabilité structurelle et de la fertilité de nombreux milieux aquatiques et terrestres. Elles ont également été recensées dans de nombreuses associations symbiotiques réalisées avec des plantes, des algues, des protistes ainsi que des animaux (Whitton et Potts, 2000) et leurs utilisations dans divers domaines, tels que la pharmacutique, la cosmétique, les bioénergies, et l'agroalimentaire, sont en cours de réflexion et/ou d'optimisation (Singh et al., 2005; Parmar et al., 2011).

Cependant, dans les écosystèmes aquatiques, les cyanobactéries sont davantage connues pour les nuisances occasionnées lors des proliférations d'espèces toxiques, également appelées efflorescences, blooms, ou encore fleurs d'eau ; phénomènes fréquemment observés dans les milieux marins et lacustres. Au cours de ces efflorescences, le fonctionnement biologique des écosystèmes aquatiques et les différents usages associés à ceux-ci (utilisations récréatives, approvisionnements en eau potable, pêcheries) se trouvent fortement perturbés. De plus, depuis plusieurs décennies, les occurrences de ces efflorescences toxiques n'ont cessé d'augmenter sur tous les continents, avec pour principales causes l'eutrophisation anthropique exacerbée des milieux aquatiques ainsi que le réchauffement global (Paerl et Paul, 2011; O'Neil et al., 2012). Ainsi, c'est la multiplication des cas d'efflorescences dans le monde, associée au caractère toxique de celles-ci, qui a provoqué une augmentation de l'intérêt et de l'implication des autorités



et du public dans la lutte contre ces phénomènes.

### 1.1.2 Taxonomie

Ces vingt dernières années, face à l'émergence et au développement des nouveaux outils moléculaires, la classification des cyanobactéries n'a cessé d'être remise en question (Komárek, 2006). Cette classification repose sur deux codes internationaux de nomenclature, celui de botanique (I.C.B.N) (McNeill et al., 2006) et celui des procaryotes (I.C.N.P) (Stanier et al., 1978; Oren et Tindall, 2005), basés essentiellement sur des critères morphologiques. Cependant, ils reconnaissent tous deux les mêmes sections ou ordres (Tableau 1) et les divergences résident essentiellement au niveau des genres et espèces. Dans l'I.C.B.N, les cyanobactéries font partie de la classe des cyanophycées, classe elle-même subdivisée en cinq ordres : les Chroococcales, les Pleurocapsales, les Oscillatoriales, les Nostocales et enfin les Stigonematales, regroupant plus de 150 genres et 2000 espèces (Chorus et Bartram, 1999). L'I.C.N.P, quant à lui, scinde les cyanobactéries en cinq sections se différenciant entre elles par l'aspect de la croissance, l'aspect et la forme des colonies, la présence, la taille et la forme de structures particulières (akinètes, hétérocystes, cellules végétatives) ainsi que la présence ou l'absence des vacuoles à gaz et des hormogonies (fragments pluricellulaires d'un filament) (Tableau 1).

En revanche, les données phylogénétiques apportées ces dernières années (Hoffmann et al., 2005) ont montré la nécessité d'utiliser une approche pluridisciplinaire intégrant des données génétiques, physiologiques, écologiques et morphologiques afin d'actualiser et d'améliorer la classification actuelle et notamment au niveau générique et spécifique.

### 1.1.3 Organisation structurelle

Malgré des caractéristiques structurelles propres aux procaryotes telles que, l'absence d'un noyau « vrai », d'organites (réticulum endoplasmique rugueux, appareil de Golgi, mitochondries, plastides...) ou encore la présence d'une paroi cellulaire de type Gram- contenant du peptidoglycane, les cyanobactéries présentent également des particularités propres aux eucaryotes.

En effet, tout comme les cellules végétales eucaryotes, elles possèdent un appareil photosynthétique complexe composé de deux photosystèmes alimentés en lumière par différents

<b>Classification Procaryotique (I.C.N.P)</b>	<b>Classification Botanique (I.C.N.B)</b>	<b>Spécificités décrites</b>
Section I	Chroococcales	Formes unicellulaires ou agrégats non filamenteux maintenus par les parois externes ou une matrice gélatineuse. Reproduction par division binaire suivant 1, 2 ou 3 plans symétriques ou non, ou par bourgeonnement. Akinètes rares.
Section II	Pleurocapsales	Formes unicellulaires ou agrégats non filamenteux maintenus par les parois externes ou une matrice gélatineuse. Reproduction par fissions multiples internes avec production de cellules filles plus petites que les cellules parentales ou par un ensemble de fissions multiples et binaires. Akinètes rares.
Section III	Oscillatoriales	Reproduction par division binaire dans un seul plan produisant des trichomes unisériés sans ramifications vraies. Trichomes composés de cellules ne se différenciant pas en hétérocystes. Akinètes non enregistrées à ce jour.
Section IV	Nostocales	Reproduction par division binaire dans un seul plan produisant des trichomes unisériés sans ramifications vraies. Une ou plusieurs cellules du trichome se différencient en hétérocystes, au moins lorsque le milieu est carencé en azote. Formation des akinètes possible.
Section V	Stigonematales	Reproduction par division binaire, parfois ou fréquemment suivant plusieurs plans, donnant naissance à des trichomes multisériés et (ou) à des trichomes présentant différents types de ramifications vraies. Formation des heterocystes et des akinètes possible.

**Tableau 1 :** Taxonomie des cyanobactéries et spécificités observées

pigments photosynthétiques. Ainsi, afin d'alimenter ces photosystèmes en photons, de la chlorophylle *a* ainsi que de nombreux caroténoïdes (zéaxanthine, myxoxanthophylle,  $\beta$ -carotène...) sont présents au niveau de la membrane des thylakoïdes. On retrouve également à l'extérieur des thylakoïdes, dans les phycobilisomes, les phycobiliprotéines (phycocyanine, allophycocyanine, allophycocyanine B, phycoérythrine, phycoérythrocyanine), des pigments accessoires collectant la majeure partie de l'énergie lumineuse utilisée pour la photosynthèse (Stanier et Cohen-Bazire, 1977).

De plus, les cyanobactéries sont capables d'accumuler des réserves de différentes natures sous formes de granules. Ainsi, les polysaccharides et plus rarement les poly- $\beta$ -hydroxybutyrique constituent les réserves carbonées, la cyanophycine (polypeptide composé d'arginine et d'asparagine) constitue les réserves azotées et plus rarement une source limitée de carbone, et enfin les polyphosphates constituent les réserves phosphatées (Carr et Whitton, 1982).

D'autres structures particulières comme les hétérocystes et les akinètes, formées par des cellules différenciées sont également retrouvées chez plusieurs espèces filamenteuses. Les hétérocystes, sont des cellules à paroi épaisse qui se différencient lors d'un appauvrissement du milieu en azote minéral et qui sont responsables de la fixation du diazote atmosphérique  $N_2$  et donc de l'avantage compétitif des cyanobactéries vis-à-vis des autres espèces algales dans l'utilisation de l'azote (Kumar et al., 2010; Carey et al., 2012). Les akinètes quant à elles, sont des cellules de dormance produites lors d'une dégradation des conditions du milieu et contenant beaucoup d'ADN ainsi que d'importantes réserves carbonées et azotées nécessaires à la germination lors du retour des conditions favorables (Lubzens et al., 2010).

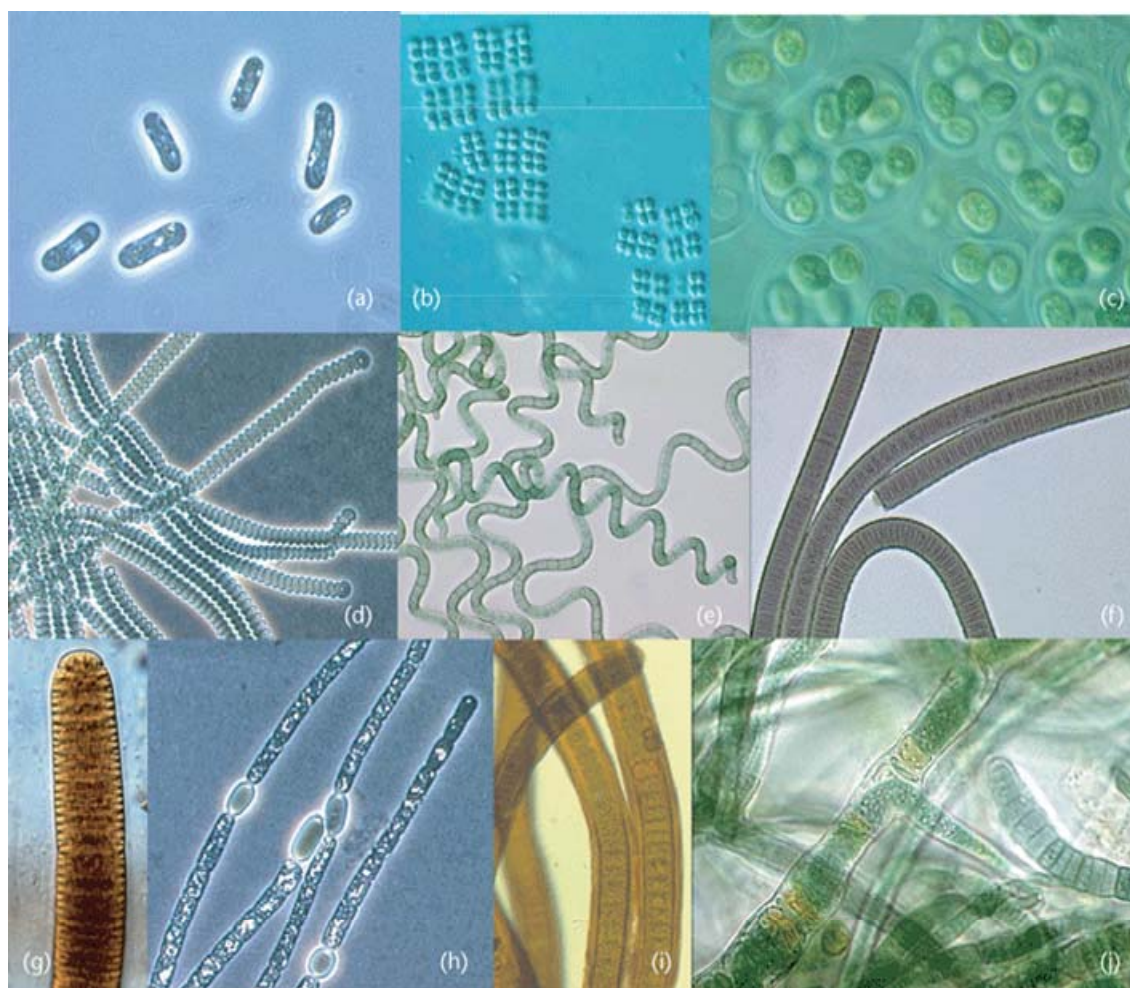
Chez certaines espèces des vacuoles à gaz sont également présentes. Celles-ci permettent aux cyanobactéries de se positionner, au cours des cycles nycthéméraux et saisonniers, dans les strates où l'optimum photosynthétique est atteint.

#### 1.1.4 Morphologie et reproduction

La diversité morphologique des cyanobactéries est très importante (Figure 1). Elles peuvent être unicellulaires sphériques, ovoïdes, cylindriques, isolées ou associées en colonies simple par l'intermédiaire d'une matrice produite au cours de la croissance. Les formes pluricellulaires se présentent sous forme de trichomes (série de cellules sans gaine de polysaccharides) ou de

filaments (série de cellules avec gaine de polysaccharides), linéaires ou spiralés, ramifiés ou non ramifiés (Chorus et Bartram, 1999).

La reproduction des cyanobactéries est asexuée. Elle peut s'effectuer par division binaire simple ou bourgeonnement avec formation d'endospores chez les unicellulaires isolées, par fragmentation simple des trichomes et des colonies non filamenteuses et enfin par fragmentation avec formation d'hormogonies, segments reproductifs riches en réserves et mobiles, chez les cyanobactéries filamenteuses (Chorus et Bartram, 1999).



**Figure 1** : Diversité morphologique des cyanobactéries (d'après Palinska, 2008). Unicellulaires: (a) cellules uniques de *Cyanothece* PCC 7418, (b) colonies régulières de *Merismopedia punctata* et (c) colonies irrégulières de *Gloeotheca* PCC 6909. Filamenteuses, sans hétérocystes: (d) *Spirulina* sp., (e) *Arthrospira* sp., (f) *Planktothrix* sp. et (g) *Hydrocoleum cantharidosmum*. Filamenteuses avec hétérocystes: (h) *Aphanizomenon flos-aquae*, (i) *Scytonema* sp. and (j) *Stigonema* sp., cyanobactérie filamenteuse avec hétérocystes et trichomes branchés.

### 1.1.5 Avantages compétitifs des cyanobactéries

Les cyanobactéries possèdent de nombreuses adaptations à l'origine de leur supériorité compétitive dans les milieux aquatiques d'eaux douces (Carey et al., 2012). L'exclusion compétitive des autres taxons phytoplanctoniques, associée à la dominance des cyanobactéries, est majoritairement observée dans les milieux eutrophes à hypereutrophes (Watanabe et al., 1992; Xie et al., 2005). Cependant, d'importants développements ont également été observés dans les milieux en cours de ré-oligotrophisation (Jacquet et al., 2005; Salmaso, 2010).

#### *1.1.5.1 Utilisation de la lumière et adaptations aux conditions lumineuses*

Les cyanobactéries possèdent des pigments photosynthétiques diversifiés, tels que la chlorophylle *a*, les caroténoïdes et les phycobiliprotéines (phycocyanine, allophycocyanine, phycoérythrine) capables de collecter une large gamme de longueurs d'ondes du spectre lumineux et ainsi d'assurer une efficacité photosynthétique élevée et de la maintenir à de faibles intensités lumineuses. Certaines espèces de cyanobactéries sont ainsi retrouvées dans les couches d'eau plus profondes, en dessous de l'épilimnion, ou dans des eaux turbides où les quantités de lumière sont faibles (Abrantes et al., 2009; Dokulil et Teubner, 2012).

Toujours afin d'utiliser efficacement la lumière, les cyanobactéries sont également capables d'ajuster leur composition pigmentaire et notamment le ratio cellulaire en phycocyanine/phycoérythrine selon les conditions lumineuses du milieu. Ce phénomène appelé « Adaptation chromatique complémentaire » a été observé chez les espèces de cyanobactéries riches en phycoérythrine (Tandeau de Marsac et Houmard, 1988; Grossman et al., 2003).

Les cyanobactéries, formant les blooms de surface, ont également la possibilité de lutter contre les rayonnements UV grâce à la synthèse de composés tels que des acides aminés proches de la mycosporine, des gaines polysaccharidiques et des caroténoïdes (Sommaruga et al., 2009).

#### *1.1.5.2 Migration verticale*

Les phénomènes de migration verticale des cyanobactéries jouent un rôle important dans leur

capacité à dominer les habitats. Ces migrations sont dépendantes de la présence ou non de vésicules à gaz, du volume de ces vésicules, du taux de synthèse/dégradation des composés photosynthétiques produits et enfin de la taille des colonies (Carey et al., 2012). De nombreuses espèces de cyanobactéries planctoniques (*Planktothrix*, *Anabeana*, *Microcystis*...) possèdent des vésicules à gaz, fournissant la flottabilité et permettant la migration verticale des cyanobactéries entre les eaux de surface lumineuses et les eaux plus profondes riches en éléments nutritifs. Dans des conditions de forte luminosité, des hydrates de carbone, issus de la photosynthèse, sont produits et accumulés dans les cellules, entraînant par conséquent une perte de flottabilité. La disparition ou la diminution de production de vésicules contribue aussi à la perte de flottabilité chez certaines espèces (Walsby et al., 2006). A l'inverse, dans des conditions de faibles luminosités, les hydrates de carbone sont consommés et de nouvelles vésicules à gaz formées afin d'augmenter la flottabilité. Par ailleurs, la disponibilité en éléments minéraux dans le milieu, et notamment en azote et en phosphore, joue également un rôle important dans la régulation de la flottabilité des cyanobactéries (Brookes et Ganf, 2001).

Grace à la présence de ces vacuoles à gaz, la cyanobactérie *Planktothrix rubescens* est par exemple capable de se développer et de former des blooms dans le métalimnion riche en nutriments, tout en évitant les températures élevées et les intensités lumineuses trop fortes présentes dans l'épilimnion (Jacquet et al., 2005).

#### 1.1.5.3 Utilisation des nutriments

Les cyanobactéries possèdent un large éventail d'inclusions cellulaires leur permettant de faire face aux faibles concentrations en nutriments dans les milieux. Elles ont la capacité de stocker sous forme de granule de polyphosphates, le phosphore, et sous forme de cyanophycine, l'azote (Allen, 1984). En ce qui concerne l'utilisation de l'azote, certaines espèces de cyanobactéries, principalement des formes filamenteuses, possèdent des hétérocystes capables de fixer le diazote atmosphérique et de le transformer en azote minéral assimilable grâce à la nitrogénase.

#### 1.1.6 Impacts des blooms de cyanobactéries sur le fonctionnement et les usages des milieux

L'apparition des blooms de cyanobactéries dans les systèmes aquatiques continentaux provoque,

très généralement, l'émergence de nombreuses perturbations environnementales, économiques et sanitaires. En effet, la présence des cyanobactéries, sous forme d'efflorescences, conduit à une diminution globale de la biodiversité des milieux où elles se développent, ainsi qu'à la diminution des efficacités de transfert de matière et d'énergie menant parfois même à des impasses trophiques dans les réseaux trophiques (Havens, 2008). Les blooms impactent notamment les autres taxons algaux par une diminution de la disponibilité en lumière, en CO<sub>2</sub> et en nutriments et par la production de molécules allélopathiques. Parallèlement, les blooms impactent également le compartiment zooplanctonique par leurs morphologies (filaments, colonies...) difficilement consommables par le zooplancton et la production de toxines entraînant une diminution de la biomasse et de la diversité spécifique de ces organismes zooplanctoniques (Hansson et al. 2007). Enfin, l'augmentation du pH, la présence de toxines et les phénomènes d'anoxie liés à la présence des blooms peuvent provoquer des phénomènes de mortalités massives de nombreuses espèces piscicoles, appelés également phénomènes de « fish kill » (Havens, 2008).

Conjointement aux effets environnementaux, les blooms sont responsables de nombreux désagréments tels que des modifications de l'aspect de la ressource par la coloration de l'eau, la formation d'écumes, la production de composés nauséabonds et enfin une dégradation des capacités de traitement et de la qualité des eaux menant à des pertes économiques considérables pour les régions touchées.

Les cyanobactéries, de part leur capacité à produire de nombreuses toxines, sont également impliquées dans de nombreux cas d'intoxications animales et plus rarement humaines (Chorus et Bartram, 1999; Briand et al., 2003). C'est d'ailleurs à la suite des premiers cas d'intoxications que les études visant à décrire et comprendre les effets des différents composés toxiques produits par les cyanobactéries sur les organismes vivants se sont largement multipliées.

## **1.2 Les toxines cyanobactériennes**

Les cyanotoxines sont produites par de nombreux genres de cyanobactéries (Tableau 2) et sont la cause de perturbations sévères chez les organismes aquatiques et terrestres (Vasconcelos, 2001; van Apeldoorn et al., 2007). Elles peuvent être de diverses natures chimiques : peptides cycliques, alcaloïdes, lipopolysaccharides (van Apeldoorn et al., 2007). Elles sont communément classées en trois grandes catégories selon leur mode d'action. Ainsi on distingue, les

hépatotoxines dont la cible biologique principale est le foie, les neurotoxines qui vont agir sur le système nerveux et enfin les dermatotoxines à l'origine de réactions allergiques et d'irritations. Ces différents composés toxiques sont constitutifs des cyanobactéries et sont libérés dans le milieu lors du processus de sénescence des cellules cyanobactériennes ou lors de la lyse cellulaire parasitaire ou virale.

<b>Types</b>	<b>Toxines</b>	<b>Genres producteurs</b>
Hepatotoxines	<b>Microcystines</b>	<i>Microcystis</i> <i>Planktothrix</i> <i>Anabaena</i> <i>Nostoc</i> <i>Anabaenopsis</i> <i>Oscillatoria</i>
	<b>Nodularines</b>	<i>Nodularia</i>
	<b>Cylindrospermopsines</b>	<i>Cylindrospermopsis</i> <i>Aphanizomenon</i> <i>Umezakia</i>
Neurotoxines	<b>Anatoxines (a, a(S), homoanatoxine-a)</b>	<i>Microcystis</i> <i>Anabaena</i> <i>Aphanizomenon</i> <i>Cylindrospermum</i> <i>Oscillatoria</i> <i>Planktothrix</i>
	<b>Saxitoxines</b>	<i>Cylindrospermopsis</i> <i>Anabaena</i> <i>Aphanizomenon</i> <i>Lyngbya</i>

**Tableau 2 :** Diversité des genres producteurs des cyanotoxines principalement observées dans les milieux aquatiques (d'après Chorus et Batram, 1999)

### 1.2.1 Les hépatotoxines

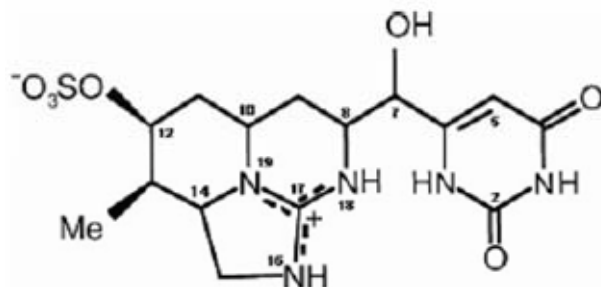
Lors des blooms de cyanobactéries, les hépatotoxines sont les molécules toxiques les plus fréquemment rencontrées et impliquées dans les cas d'intoxications. Elles sont responsables de lésions hépatiques chez les vertébrés, par l'inactivation des protéines phosphatases (PP) 1, 2A et 3 (Honkanen et al., 1994). De plus, des modifications fonctionnelles et structurales des reins et des intestins ainsi que des effets génotoxiques et carcinogènes ont également été discutés (van



Apeldoorn et al., 2007). On regroupe dans ces hépatotoxines, la cylindrospermopsine, les nodularines (NODs) et les microcystines (MCs).

#### 1.2.1.1 La cylindrospermopsine

Détectée pour la première fois dans les milieux tropicaux, la cylindrospermopsine est également observée sous les climats tempérés et notamment en Nouvelle-Zélande, en Europe et sur le continent américain (Falconer et Humpage, 2006). Elle est principalement produite par le genre *Cylindrospermopsis*, mais d'autres genres tels que *Aphanizomenon*, *Anabaena*, *Umezakia*, *Raphidiopsis* ont également été identifiés comme producteurs de cette toxine (Falconer et Humpage, 2006). La cylindrospermopsine est un alcaloïde de 415 Da (Figure 1), hydrophile avec une dégradation particulièrement lente dans l'eau. Deux variants de la cylindrospermopsine ont été identifiés à ce jour, la 7-épicylindrospermopsine possédant une toxicité équivalente à la molécule mère et la 7-desoxycylindrospermopsine dont la toxicité fait encore débat (Looper et al., 2005; Falconer et Humpage, 2006).



**Figure 2 :** Structure chimique de la cylindrospermopsine (d'après Falconer et Humpage 2006).

La toxicité de la cylindrospermopsine provient de sa capacité à inhiber la synthèse protéique des tissus touchés causant d'importantes modifications fonctionnelles des organes et même la mort des organismes affectés selon la durée et la dose d'exposition. Ainsi les principaux organes touchés sont caractérisés par une synthèse et un turn-over protéique important comme le foie, les reins, l'intestin (Falconer et Humpage, 2006). De plus, la cylindrospermopsine est capable de s'insérer dans la double hélice d'ADN causant des cassures chromosomiques et des inhibitions

irréversibles de la synthèse protéique. Ainsi la cylindrospermopsine est considérée comme une molécule cytotoxique, clastogène, mutagène et avec une activité carcinogène potentielle (Falconer et Humpage, 2006).

#### 1.2.1.2 Les nodularines et les microcystines

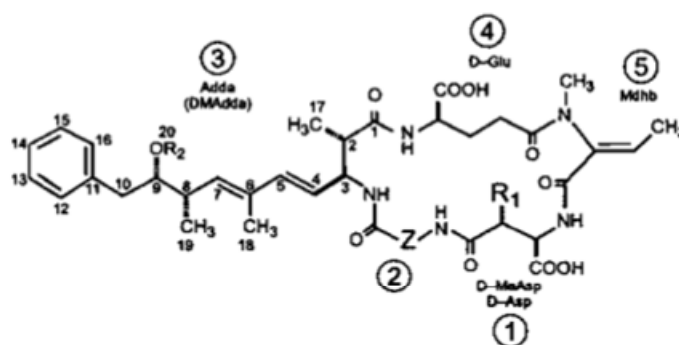
Les NODs et les MCs tiennent leurs noms des cyanobactéries à partir desquelles elles ont été isolées pour la première fois, à savoir *Nodularia Spumigena* et *Microcystis aeruginosa* (Carmichael, 1992). Les MCs sont également produites par les genres *Anabeana* sp., *Planktothrix* sp., *Nostoc* sp., *Chroococcus* sp., *Anabaenopsis* sp. et *Hapalosiphon* sp.. En revanche, les NODs sont quant à elles uniquement produites par le genre *Nodularia* sp. (Pearson et al., 2010).

Les NODs et les MCs sont des peptides cycliques composées respectivement de cinq (Figure 3) et de sept acides aminés (Figure 4) de poids moléculaires pouvant varier de 800 à 1100 Da (Chorus et Bartram, 1999). Des variations structurales de la microcystine ont été caractérisées pour les sept acides aminés mais plus fréquemment par des substitutions des acides aminés en position 2 et 4 ainsi que des déméthylation des résidus N-méthyl-déhydroalanine (Mdha) et D-érythro- $\beta$ -méthyl-D-acide aspartique (Measp). Ainsi à l'heure actuelle, 89 variants de la microcystine ont été identifiés (Welker et Von Döhren, 2006). Contrairement à la microcystine, les processus de déméthylation ont été observés à ce jour seulement pour la nodularine. De ce fait, seuls 7 variants de la nodularine ont été identifiés (Pearson et al., 2010).

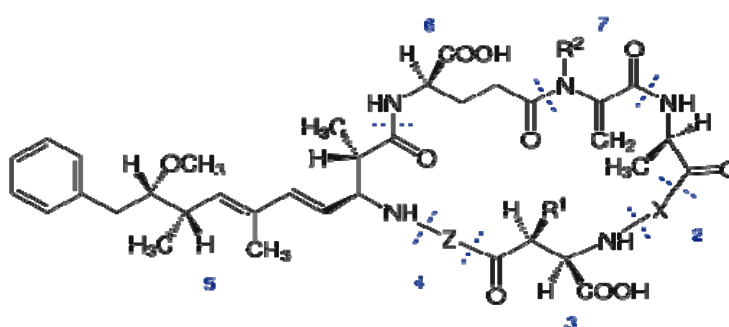
La biosynthèse de ces deux cyanotoxines se fait par la voie non ribosomale impliquant des complexes enzymatiques multifonctionnels. Les gènes responsables de la biosynthèse de la microcystine (9 à 10 gènes selon l'espèce) et de la nodularine (9 gènes) codent pour différents types de protéines tels que des peptides synthétases non ribosomales (NRPS), des polykétides synthases (PKS), des enzymes de finalisation des queues peptidiques et enfin des transporteurs ABC (Dittmann et Börner, 2005).

La toxicité des NODs et des MCs provient de leur capacité à inhiber fortement les PPs. Cette inhibition se réalise en deux temps, tout d'abord *via* la formation d'une interaction non covalente du domaine Adda-glutamate de la microcystine avec le site catalytique des protéines phosphatases PP1 et PP2A, puis par l'interaction covalente du résidu Mdha de la microcystine avec les résidus cystéines 273 et 266 de la PP1 et PP2A respectivement (Martins et Vasconcelos, 2009). Contrairement à la microcystine, les interactions covalentes des nodularines avec les PPs

ne peuvent pas avoir lieu du fait de l'absence du résidu Mdha de cette cyanotoxine. Ainsi, l'inhibition des PP par ces deux cyanotoxines entraîne une hyperphosphorylation de nombreuses protéines causant des désagréments au niveau du cytosquelette, la perte des jonctions cellulaires, des perturbations du métabolisme et du contrôle du cycle cellulaire (Campos et Vasconcelos, 2010). De plus, la microcystine est également responsable de l'augmentation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) à l'origine de nombreuses perturbations cellulaires (Amado et Monserrat, 2010). Ainsi toutes ces altérations peuvent être à l'origine du dysfonctionnement des organes touchés (principalement le foie) pouvant entraîner la mort des organismes intoxiqués et potentiellement la promotion et/ou de l'initiation de tumeurs (Campos et Vasconcelos, 2010).



**Figure 3 :** Structure chimique de la nodularine (d' après Chorus et Bartram 1999). Z est un acide aminé variable, R est constitué par H ou CH<sub>3</sub>.



**Figure 4 :** Structure chimique de la microcystine (d' après Chorus et Bartram 1999). Z et X sont des acides aminés variables, R est constitué par H ou CH<sub>3</sub>.

## 1.2.2 Les neurotoxines

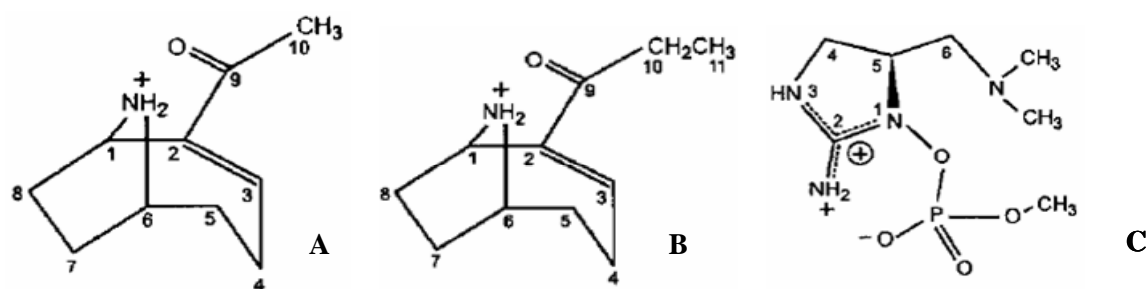
Au sein de ces neurotoxines sont regroupées, les anatoxines, les saxitoxines et la  $\beta$ -N-methylamino-L-alanine (BMAA). Elles ciblent le système neuromusculaire et provoquent des paralysies musculaires, notamment du système respiratoire, entraînant la mort des organismes touchés, en quelques heures voir même quelques minutes (Chorus et Bartram, 1999).

### 1.2.2.1 Les Anatoxines

Les anatoxines sont des molécules de nature alcaloïdique produites spécifiquement par les cyanobactéries. L'anatoxine-a fut isolée pour la première fois à partir de la cyanobactérie *Anabaena flos-aquae*, puis d'autres espèces d'*Anabaena* mais également d'autres genres tels que *Planktothrix*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis* et plus rarement *Microcystis* (Carmichael, 1992; van Apeldoorn et al., 2007). C'est une amine secondaire de faible poids moléculaire (165 Da) (Figure 5A) responsable de la dépolarisation des jonctions neuromusculaires. En effet c'est une molécule agoniste des récepteurs nicotiques post-synaptiques mimant les effets de l'acétylcholine. Cependant, contrairement à l'acétylcholine, l'anatoxine-a n'est pas sujette à l'hydrolyse enzymatique par les acétylcholinestérases et ainsi cause une dépolarisation prolongée des jonctions neuromusculaires bloquant la transmission du stimulus électrique et entraînant la paralysie musculaire (van Apeldoorn et al., 2007). Ainsi, on peut observer chez les organismes touchés des arrêts respiratoires responsables de leur mort (Briand et al., 2003).

L'homooanatoxine-a (179 Da) (Figure 5B), est un dérivé méthyle de l'anatoxine-a responsable du blocage des contractions musculaires par l'augmentation des flux de  $\text{Ca}^{2+}$  au niveau des terminaux nerveux cholinergiques. Ses effets sont comparables à ceux de l'anatoxine-a et entraînent rapidement la mort des individus intoxiqués (van Apeldoorn et al. 2007).

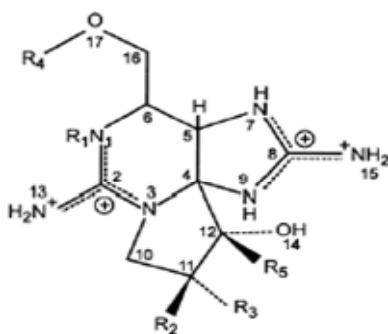
L'anatoxine-a(s) (Figure 5C) est un ester de phosphate de la N-hydroxyguanine (252 Da) dont aucun variant n'a été observé à ce jour. Seul deux espèce d'*Anabaena* semblent produire cette toxine : *A. flos-aquae* et *A. lemmermannii* (van Apeldoorn et al., 2007). Contrairement à l'anatoxine-a, l'anatoxine-a(s) est un inhibiteur de l'acétylcholinestérase entraînant une hyperactivation des neurones post-synaptiques menant à une paralysie musculaire menant à des faiblesses musculaires, des convulsions et à la mort des organismes touchés par arrêt respiratoire.



**Figure 5 :** Structure chimique de l'anatoxine-a (A), de l'homoanatoxine-a (B) et de l'anatoxine-a(s) (C) (d'après Chorus et Bartram, 1999).

#### 1.2.2.2 Les saxitoxines

Les saxitoxines sont particulièrement connues pour les phénomènes d'empoisonnement paralysant par les fruits de mer observés chez les animaux et les humains (PSP, Paralytic Shellfish Poisoning) et furent pour la première fois isolées à partir de fruits de mer ayant filtrés des dinoflagellés marins producteurs de ces neurotoxines (Anderson, 1994; Briand et al., 2003). Les saxitoxines (Figure 6) sont des alcaloïdes à un noyau tétrahydropurique regroupant la saxitoxine et la neosaxitoxine, les gonyautoxines (GTxs) et les C-toxines (van Apeldoorn et al., 2007). A ce jour, 22 variants ont été répertoriés en fonction du nombre de groupe  $\text{SO}_3^-$  dans la molécule (Ferrão-Filho et Kozlowsky-Suzuki, 2011).



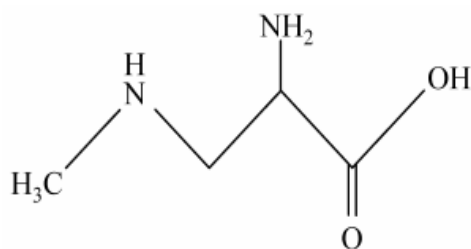
**Figure 6 :** Structure chimique des saxitoxines. R est variable en fonction des variants (d'après Chorus et Bartram, 1999).

Chez les cyanobactéries, ces neurotoxines ont été isolées à partir des genres *Anabaena*, *Lyngbya*, *Planktothrix* et *Cylindrospermopsis* (van Apeldoorn et al., 2007). Toutes les saxitoxines agissent sur les organismes vivants de la même manière en bloquant les canaux sodium voltage dépendant

et donc la transmission nerveuse menant à la paralysie musculaire et la mort par arrêt respiratoire des organismes atteints. Cependant, il existe des différences de toxicité entre les différents variants, la saxitoxine étant la molécule la plus toxique.

### 1.2.2.3 La $\beta$ -N-methylamino-L-alanine (BMAA)

La BMAA (Figure 7), dont la structure est similaire à celle de l'alanine, est l'unique acide aminé non impliqué dans la synthèse protéique. Cette acide aminé serait produit par un très grand nombre de cyanobactéries qu'elles soient symbiotiques, planctoniques ou benthiques, issues des milieux terrestres ou aquatiques (Cox et al., 2005). Après ingestion, la BMAA agit comme un agoniste des récepteurs glutaminergique au niveau des synapses glutaminergique entraînant une excitation des neurones. Elle pourrait être impliquée dans de nombreuses maladies neurodégénératives (Cox et al., 2005).



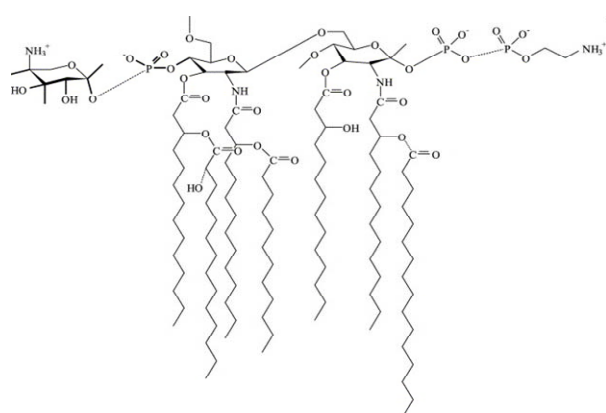
**Figure 7 :** Structure chimique de la  $\beta$ -N-méthylamino-L-alanine (BMAA) (d'après Jonasson et al. 2008).

### 1.2.3 Les dermatotoxines

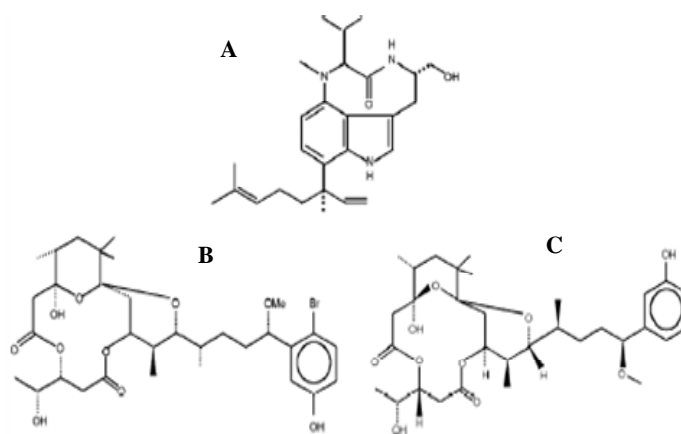
Parmi les dermatotoxines les mieux connues, les lipopolysaccharides (LPS) sont des endotoxines constitutives de la paroi cellulaire des bactéries Gram-, et notamment des cyanobactéries, ou ils forment des complexes avec les protéines et les phospholipides. Les LPS cyanobactériens ont été isolés pour la première fois à partir d'*Anacystis nidulans* (Chorus et Bartram, 1999). Ce sont des produits condensés de sucres et d'acides gras (Figure 8) dont la composition peut varier en fonction des espèces de cyanobactéries (Chorus et Bartram, 1999). Les LPS ont une activité pyrogène et provoquent des irritations importantes principalement dues à leurs composés

lipidiques. Ainsi chez les humains et les animaux, elles sont responsables de réactions allergiques et d'irritations cutanées parfois sévères (Chorus et Bartram, 1999).

D'autres toxines moins connues, telles que la lyngbyatoxine A (Figure 9A), la debromoaplysiatoxine (Figure 9B) et les aplysiatoxines (Figure 9C), toutes de nature alcaloïdique, sont également responsables de fortes irritations cutanées et d'inflammations gastro-intestinales (Chorus et Bartram, 1999). De potentiels effets promoteurs de tumeurs sont également suspectés pour ces alcaloïdes. En revanche, à ce jour, ces toxines n'ont pu être observées qu'en milieu marin (Chorus et Bartram, 1999; Briand et al., 2003).



**Figure 8 :** Structure chimique des lipopolysaccharides (LPS) (d'après Wiegand et Pflugmacher 2005).



**Figure 9 :** Structure chimique de la lyngbyatoxine A (A), de la debromoaplysiatoxine (B) et de l'aplysiatoxine (C) (d'après Chorus et Bartram, 1999).

### **1.3 Les impacts des cyanobactéries et des microcystines sur le zooplancton et les poissons**

De toutes les toxines produites par les cyanobactéries, c'est sans nul doute la microcystine qui est la plus fréquemment impliquée dans les phénomènes d'empoisonnement de la faune sauvage et domestique ou, plus rarement, de l'homme (Chorus et Bartram, 1999). Au cours du XX<sup>ème</sup> et XXI<sup>ème</sup> siècle, le nombre d'études *in-situ* et expérimentales montrant les cyanobactéries, productrices de MCs, comme des organismes perturbateurs du fonctionnement des écosystèmes aquatiques n'a cessé d'augmenter. En eaux douces et notamment en lac, les occurrences de cyanobactéries toxiques n'ont cessé de s'accroître au cours des 30 dernières années et ceci partout dans le monde (Whitton & Potts 2000). La conséquence de ces blooms de cyanobactéries, a été l'apparition de perturbations importantes de la structure et du fonctionnement des réseaux trophiques lacustres. En effet de nombreuses études ont montré que les organismes zooplanctoniques et l'ichtyofaune pouvaient être fortement impactés par les cyanobactéries et leurs MCs (Malbrouck & Kestemont, 2006; Wilson et al., 2006; Tillmanns et al., 2008).

#### **1.3.1 Interactions cyanobactéries-zooplancton herbivore**

Le compartiment zooplanctonique herbivore (consommateurs primaires des lacs) est un compartiment clef des réseaux trophiques aquatiques, responsable du transfert de matière et d'énergie du compartiment phytoplanctonique au compartiment piscicole. Cependant, les cyanobactéries sont connues pour engendrer des effets néfastes sur les organismes brouteurs (Bernardi et Giussani, 1990). Usuellement, les cyanobactéries sont considérées comme une ressource alimentaire peu appropriée et de faible qualité pour le zooplancton, ceci en raison de trois facteurs principaux: la morphologie des cyanobactéries, la composition nutritionnelle et enfin la production de composés toxiques (Porter et Orcutt, 1980; Wilson et al., 2006).

##### *1.3.1.1 La contrainte morphologique*

La taille et la morphologie des cyanobactéries varient en fonction des genres. Ainsi, dans les milieux aquatiques, on peut observer des picocyanobactéries, cyanobactéries unicellulaires de



petites tailles ( $>2-3\ \mu\text{m}$ ), et des formes plus complexes, de grandes tailles (colonies, filaments, ...), à l'origine de la formation des blooms.

Il est admis que les formes coloniales et filamenteuses de cyanobactéries peuvent interférer mécaniquement sur les organismes zooplanctoniques brouteurs en bloquant leur appareil de filtration et en diminuant ainsi la quantité de nourriture ingérée (Lampert, 1987). Lampert (1987) à également mis en avant que les formes filamenteuses et coloniales les plus grandes ne sont en fait que très peu utilisées et n'entraînent donc qu'un effet mineur sur l'appareil de filtration des brouteurs. C'est à l'inverse les colonies et les filaments de plus petites tailles qui seraient à l'origine de l'inhibition de l'efficacité de l'appareil de filtration des brouteurs et ainsi de la diminution de la croissance, la fécondité et de la survie du zooplancton brouteur (Lampert, 1987). Cependant, les effets de la morphologie des cyanobactéries sur l'efficacité de filtration des organismes zooplanctoniques semblent variables en fonction des espèces de zooplancton considérées. Ainsi, les copépodes, les rotifères et les plus petites espèces de cladocères semblent moins impactés par la présence de cyanobactéries dans les milieux du fait de leur résistance généralement plus forte et de leur capacité à sélectionner les particules à ingérer (Hansson et al., 2007). D'autres études soulignent le fait que certaines espèces de Cladocères pourtant considérées comme sensible telles que *Daphnia*, répondent de manières spécifiques aux différentes espèces de cyanobactéries (Chan et al., 2004; Wilson et al., 2006). Ainsi, de meilleurs taux de croissance peuvent être observés pour des Cladocères de grandes tailles plutôt que pour des rotifères ou des copépodes en présence de cyanobactéries de formes coloniales. De plus, les formes filamenteuses peuvent constituer une meilleure ressource, pour les rotifères, les cladocères et les copépodes que les formes unicellulaires simples (Wilson et al., 2006). En effet, les formes unicellulaires peuvent contenir d'importantes quantités de métabolites secondaires encore non identifiés agissant comme des toxines et présenter un déficit nutritionnel important en termes de composition en acides gras. Ainsi, les formes unicellulaires, qui sont ingérées facilement par les espèces zooplanctoniques, entraîneraient plus d'effets délétères que les formes filamenteuses dont l'ingestion est limitée.

Ces observations contradictoires suggèrent que les performances des différentes espèces zooplanctoniques se nourrissant de cyanobactéries sont influencées par d'autres facteurs que la morphologie comme la présence de composés toxiques ou le déficit en composés essentiels.

### 1.3.1.2 La composition nutritionnelle

D'une manière générale, les cyanobactéries sont considérées comme une nourriture de faible qualité pour le zooplancton en comparaison des chlorophycées, des diatomées ou encore des flagellés autotrophes (Gulati & Demott 1997). Cette faible valeur nutritionnelle est à associer principalement aux faibles teneurs en acides gras polyinsaturés essentiels (AGPI) (Brett et Müller-Navarra, 1997; Ravet et Brett, 2006). Les AGPI sont particulièrement importants chez les invertébrés car ce sont des précurseurs des eicosanoïdes<sup>1</sup> qui sont particulièrement importants pour de nombreuses fonctions physiologiques de la reproduction telles que la production et l'éclosion des œufs (Brett et Müller-Navarra, 1997). Les acides gras saturés sont également importants en raison de leur contenu à haut pouvoir calorifique, utilisé principalement en tant qu'énergie. Ainsi, ce déficit nutritionnel peut être à l'origine d'une diminution du développement du zooplancton et notamment des cladocères en affectant négativement leur croissance somatique ainsi que leur fécondité (Brett & Müller-Navarra, 1997). Par ailleurs, d'autres résultats semblent montrer que cette faible valeur nutritionnelle proviendrait plutôt d'un déficit en stérols (Von Elert et Wolffrom, 2001; Von Elert et al., 2003). En effet les stérols sont indispensables au maintien de l'intégrité structurale et fonctionnelle des membranes cellulaires et sont également des précurseurs hormonaux. Le zooplancton, incapable de synthétiser *de novo* les stérols, est donc tributaire de ceux présents dans les producteurs primaires phytoplanctoniques.

### 1.3.1.3 Les composés toxiques

Les rôles des composés toxiques produits par les cyanobactéries sont encore mal connus. L'une des hypothèses principales, quant aux rôles de ces cyanotoxines, est l'utilisation de ces composés toxiques et notamment des microcystines comme moyen de défense pour faire face à la pression de prédation exercée par les organismes zooplanctoniques brouteurs (Lampert, 1987). Dans ce sens, plusieurs expériences ont pu mettre en évidence une augmentation de la production de microcystine par des cyanobactéries dans un milieu contenant ou ayant contenu du zooplancton (Jang et al., 2003, 2008). Cependant, une étude phylogénique des gènes codant pour la microcystine synthétase suggère que la capacité des cyanobactéries à produire cette toxine serait antérieure à la présence des métazoaires prédateurs (Rantala et al., 2004).

---

<sup>1</sup> Vaste famille de dérivés d'oxydation d'acides gras polyinsaturés à 20 atomes de carbone

Expérimentalement, les effets des composés toxiques cyanobactériens et notamment des MCs sur le zooplancton ont été étudiés (e.g. Lampert, 1987; Wilson et al., 2006). La majorité des auteurs s'accordent à dire que la toxicité associée à la présence des MCs, affecte le développement et la survie du zooplancton (Jang et al., 2003; Guo et Xie, 2006; Wilson et al., 2006; Tillmanns et al., 2008). En effet, le taux de survie, l'âge à maturité, la croissance somatique, la fécondité et la taille des individus sont négativement corrélés avec la présence de ces toxines. Les MCs seraient responsables d'une part du blocage non mécanique de la filtration et d'autre part d'effets toxiques, liés à leur capacité à inhiber les protéines phosphatases, entraînant d'importants dysfonctionnements cellulaires (Lampert, 1987; Rohrlack et al., 2005a). De plus, par l'utilisation de souches cyanobactériennes mutantes non productrices des MCs, d'autres études ont pu démontrer que la toxicité des cyanobactéries vis-à-vis du zooplancton pourrait également être due à la production d'autres composés toxiques comme des inhibiteurs de protéases ou de protéines impliqués dans la formation de la carapace (Rohrlack et al., 2001; Kaebernick et al., 2001; Lüring, 2003; Czarnecki et al., 2006). Néanmoins, les effets des cyanobactéries sur le zooplancton ne sont pas toujours homogènes. Des différences de sensibilité interspécifiques et intraspécifiques face aux cyanobactéries sont observées (Lampert, 1987; Wilson et al., 2006; Tillmanns et al., 2008). Par ailleurs, plusieurs études ont mis en avant des phénomènes de tolérance induite chez les cladocères leur permettant de limiter les effets négatifs associés à la présence de cyanobactéries dans l'environnement (Gustafsson & Hansson, 2004; Guo & Xie, 2006).

Cependant, la majorité des études réalisées sur les interactions cyanobactéries-zooplancton se sont focalisées sur le genre *Daphnia*, considéré comme un organisme clef des réseaux trophiques lacustres, ressource indispensable pour l'ichtyofaune (Wilson et al. 2006; Tillmanns et al. 2008). En raison des résultats contradictoires obtenus par les différents auteurs quant aux effets des cyanobactéries sur le zooplancton et notamment sur le genre *Daphnia*, il est impossible de tirer des conclusions définitives et générales à ce sujet. Cependant les observations *in-situ* réalisées lors des blooms de cyanobactéries ont permis de mieux comprendre et d'avoir une vision plus juste des effets des blooms sur les communautés zooplanctoniques (Ghadouani et al. 2003; Hansson et al. 2007).

#### 1.3.1.4 Effets in-situ des blooms de cyanobactéries sur le zooplancton dans les écosystèmes

D'une manière générale, en présence de cyanobactéries toxiques dans les milieux, la biomasse totale zooplanctonique semble négativement corrélée avec les concentrations en MCs mesurées *in situ* (Hansson et al., 2007). Cependant, en raison des différences de sensibilité des différents taxa zooplanctoniques face aux cyanobactéries, des changements spécifiques importants s'opèrent lors des blooms. Ainsi lorsque les cyanobactéries dominent le compartiment phytoplanctonique, la biomasse des cladocères et des copépodes de grandes tailles, organismes peu sélectifs, diminue fortement (Ghadouani et al., 2003; Hansson et al., 2007). Cependant, les communautés zooplanctoniques de petites tailles telles que les rotifères, les cladocères du genre *Bosmina*, *Ceriodaphnia*, *Moina* ainsi que les copépodes cyclopoïdes, capables de sélectionner leurs ressources, dominent généralement les milieux en cas de proliférations de cyanobactéries (Ferrão-Filho et al., 2002; Ferrão-Filho et Azevedo, 2003; Hansson et al., 2007).

Par ailleurs, l'accumulation des MCs dans le zooplancton n'est pas rare. En effet celui-ci est considéré comme le meilleur bioaccumulateur de MCs des réseaux trophiques, devançant les gastropodes et les bivalves (Ferrão-Filho et Kozlowsky-Suzuki, 2011). Ferrão-Filho et al. (2002) ont montré qu'une communauté zooplanctonique composée majoritairement de rotifères, de copépodes cyclopoïdes et de cladocères de petite taille accumule les MCs jusqu'à des concentrations de  $16.4 \mu\text{g.g}^{-1}$  de poids sec (P.S). Dans des lacs canadiens, des valeurs supérieures à  $67 \mu\text{g.g}^{-1}$  de P.S ont pu être mesurées dans le zooplancton (Kotak et al., 1996). Dans le lac IJsselmeer (Pays-Bas), les valeurs moyennes estivales mesurées sur la communauté zooplanctonique étaient comprises entre 57 et  $192 \mu\text{g.g}^{-1}$  de P.S (Ibelings et al., 2005).

Ainsi, le zooplancton, considéré comme un lien trophique essentiel entre les producteurs primaires et l'ichtyofaune, peut constituer un compartiment vecteur de MCs pour le compartiment piscicole lors d'épisodes de blooms cyanobactériens (Mohamed, 2001; Ibelings et al., 2005). De plus, au cours de leurs différents stades ontogéniques (larve, juvénile et adulte) ou durant la totalité de leur vie, la majorité des espèces de poissons présentes en eau douce sont zooplanctonophages strictes. En cas de bloom, ces poissons vont donc être susceptibles d'ingérer, *via* leur alimentation, d'importantes quantités de MCs responsables de perturbations physiologiques, histologiques et comportementales pouvant expliquer des perturbations importantes dans les dynamiques de population de ces espèces.

### 1.3.2 Impacts des blooms de cyanobactéries et des microcystines sur les populations de poissons

Lors des blooms de cyanobactéries, les espèces piscicoles peuvent être situées dans une couche d'eau contenant des cellules toxiques ainsi que des toxines dissoutes. Ainsi, elles peuvent être exposées aux toxines *via* divers voies : soit directement *via* l'ingestion de cellules cyanobactériennes et/ou d'organismes zooplanctoniques contaminés, soit indirectement *via* le passage de l'eau (chargée en toxines dissoutes) à travers leur système branchial. L'absorption des toxines *via* les transferts trophiques semble être la voie d'entrée principale des cyanotoxines dans les poissons (Xie et al., 2005; Ame et al., 2010; Romo et al., 2011). Cependant, la présence des blooms de cyanobactéries dans les milieux entraîne de nombreuses perturbations écosystémiques annexes potentiellement responsables des perturbations observées sur l'ichtyofaune. En effet, la présence des blooms cyanobactériens est souvent associée à des changements de composition mais aussi d'abondance des organismes zooplanctoniques correspondant à une perte qualitative et quantitative de nourriture pour les poissons (Hansson et al., 2007). De plus, les blooms sont aussi responsables de modifications physico-chimiques des milieux tels que des modifications du pH, des concentrations en O<sub>2</sub> dissous et en nutriments souvent à l'origine d'une dégradation importante des conditions du milieu affectant ainsi le développement des poissons (Paerl et al., 2001; Wiegand et Pflugmacher, 2005).

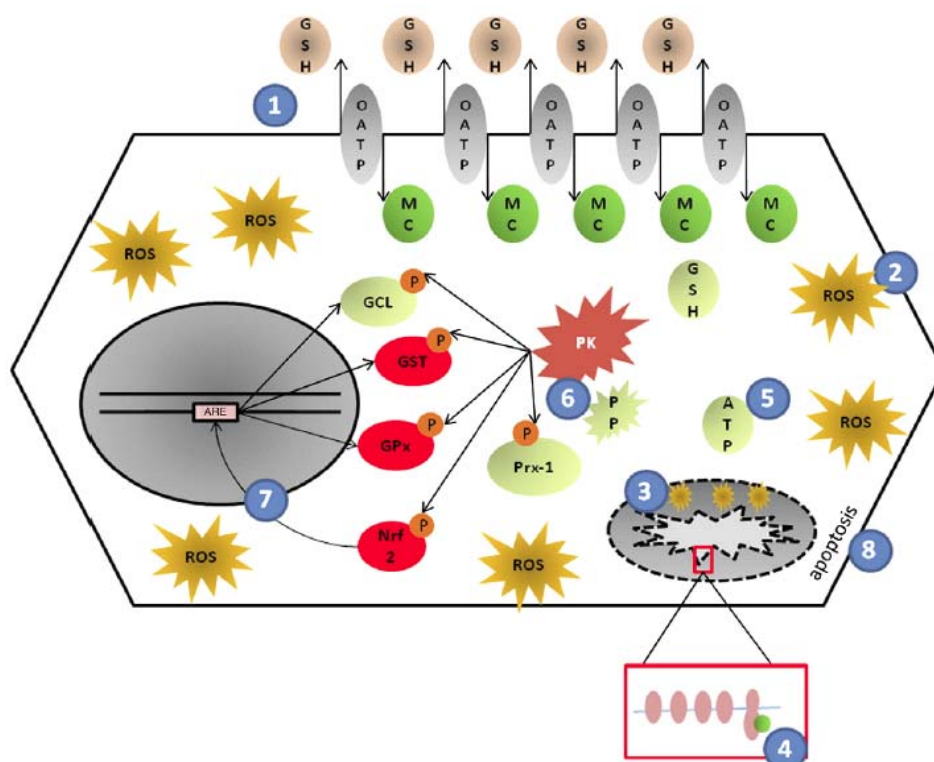
#### 1.3.2.1 Mortalité massive des poissons ou phénomène de « Fish kill »

Partout dans le monde, des mortalités massives de poissons ont été observées à la suite de blooms de cyanobactéries. Des espèces phytoplanctonophages aux espèces carnivores, toutes les classes trophiques de poissons peuvent être atteintes de manière létale par la présence des efflorescences de cyanobactéries (Fischer et Dietrich, 2000; Bürgi et Stadelmann, 2002; Ibelings et al., 2005). Ces phénomènes sont généralement observés au cours du processus de la sénescence des cellules cyanobactériennes (Bürgi et Stadelmann, 2002; Albay et al., 2003; Chellappa et Chellappa, 2008). Ce processus est provoqué principalement par le changement des conditions environnementales qui va entraîner des perturbations de la flottabilité des cyanobactéries et leur accumulation à la surface des eaux (Paerl et Ustach, 1982). Ainsi, ce sont les conditions de surface (faibles concentrations en nutriments, fortes intensités lumineuses, températures et vent

principalement) qui sont responsables de l'induction de la lyse des cellules cyanobactériennes et par conséquent de la libération des toxines. Cependant le lien direct entre les mortalités massives de poisson et les cyanotoxines, et notamment les MCs, n'est pas clair. En effet, plusieurs études pointent du doigt le fait que ces mortalités piscicoles seraient principalement dues à l'asphyxie des poissons lors des conditions hypoxiques qui ont lieu pendant la dégradation bactérienne des cellules sénescents (Jewel et al., 2003; Malbrouck et Kestemont, 2006) plutôt qu'à la présence des cyanotoxines.

Malgré ces observations, tous les blooms de cyanobactérie ne sont pas responsables de mortalités massives de poisson. La dissolution des toxines dans l'eau est souvent rapide et les concentrations mesurées généralement en dessous du seuil létal. De plus les espèces piscicoles sont capables d'éviter les zones de bloom en migrant dans des zones plus favorables à leur maintien (Mastin et al., 2002).

Par ailleurs, les poissons sont également exposés aux toxines de manière chronique et non létale à court terme. Toutefois, de nombreuses expériences et observations ont pu montrer que, dans ces cas de contamination chronique, malgré des concentrations en cyanotoxines moindres en comparaison des blooms massifs responsables de fortes mortalités piscicoles, de nombreuses perturbations comportementales, physiologiques et histologiques pouvaient être observées et par conséquent entraîner des perturbations importantes sur les espèces piscicoles (Malbrouck et Kestemont 2006).



1. Incorporation des MCs via les OATPs qui utilisent le GSH = diminution du GSH intracellulaire
2. L'efflux de GSH (première défense contre les ROS) peut augmenter la production de ROS
3. La diminution du GSH cytoplasmique entraîne une diminution du GSH mitochondrial, ce qui favorise la production de ROS et des perturbations de la chaîne de transport d'électrons. Le stress oxydatif augmente également la perméabilité des membranes mitochondriales augmentant ainsi les risques d'apoptose des cellules
4. Les MCs peuvent s'attacher aux sous-unités  $\beta$  des ATP-synthases, ce qui peut réduire la synthèse d'ATP et contribuer à l'intensification des dommages membranaires au niveau des mitochondries et à la production des ROS
5. Les perturbations mitochondriales entraînent une réduction de la synthèse d'ATP, affectant tous les processus cellulaires qui dépendent de l'ATP et notamment la synthèse de GSH
6. Inhibition des protéines phosphatases, entraînant un état d'hyperphosphorylation de la cellule
7. L'environnement pro-oxydatif et hyperphosphorylé de la cellule favorise la migration du facteur de transcription Nrf2 jusqu'au noyau, ce qui induit la transcription des gènes impliqués dans la réponse antioxydante (GST, GPx, GCL). La phosphorylation et l'épuisement de l'ATP inhibent l'activité de la GCL, favorisant l'épuisement continu du GSH. La phosphorylation active la GST et la GPx, mais les faibles concentrations en GSH limitent leurs activités de détoxification des MCs et du  $H_2O_2$ . Enfin, l'inhibition des peroxyredoxines par la phosphorylation contribue à la diminution de la capacité de détoxification de la cellule.
8. Tous ces événements associés causent l'altération du statut redox de la cellule et des perturbations mitochondriales qui peuvent entraîner la libération de cytochrome c, qui active la cascade de signal responsable de l'apoptose

**Figure 10 :** Modèle hypothétique des effets toxiques induits par les microcystines (d'après Amado and Monserrat 2010). MC: microcystines; GSH: glutathion; OATP: transporteurs membranaires d'acides biliaires; ROS: espèces réactives de l'oxygène; PK: protéines kinases; PP: protéines phosphatases; Prx-1 : peroxyredoxine; GCL: glutamate cystéine ligase; GST: glutathion-S-transferase; GPx: glutathion peroxydase; Nrf-2: facteur de transcription; ARE: Elément de réponse antioxydant.

### 1.3.2.2 Assimilation et transport des microcystines

Dans les milieux aquatiques, les concentrations en MCs ne sont généralement pas responsables d'intoxication aigüe des espèces piscicoles (Ame et al., 2010; Romo et al., 2011; Palikova et al., 2011). Lors des blooms de cyanobactéries, les espèces piscicoles sont soumises à plusieurs voies potentielles de contamination. Ainsi, les toxines provenant de l'eau peuvent être absorbées directement par les branchies ou l'intestin. Cependant, les poissons absorbent principalement les toxines, *via* le système digestif, après l'ingestion orale de cellules de cyanobactéries ou de proies intoxiquées. Du fait des différentes catégories trophiques existantes chez les poissons, des différences de sensibilité aux toxines entre les espèces sont observées mais les résultats contradictoires qui existent entre les études ne permettent pas de mettre en avant le niveau trophique piscicole le plus touché par les MCs (Xie et al., 2005; Qiu et al. 2007; Zhang et al., 2009).

Une fois présentes dans l'intestin, les MCs sont dégradées lentement et peuvent être absorbées au niveau de l'ileum, par l'intermédiaire de polypeptides transporteurs d'anions organiques (OATPs) (Figure 10), et gagner la circulation sanguine (Bury et al., 1998). Les concentrations en MCs qui vont circuler dans le sang sont donc dépendantes du temps d'exposition aux toxines, de la dose de toxine ingérée, du mode d'exposition aux toxines, du variant de la toxine ainsi que de la longueur de l'intestin du poisson. Dans le sang, les MCs vont être transportées par la veine porte vers le foie où elles vont être absorbées par les OATPs dans les hépatocytes et accumulées préférentiellement (Fischer et al., 2005). Cependant, les MCs sont également capables de s'accumuler dans les reins, la bile, le sang, les intestins, les muscles et le cerveau des poissons exposés aux cyanobactéries (Xie et al., 2004; Cazenave et al., 2005; Ferrão-Filho et Kozlowsky-Suzuki, 2011). Pour atteindre ces organes, le mode de transport des MCs n'est néanmoins pas encore clair. En effet, il est supposé que les MCs atteignent ces organes soit directement en utilisant la circulation sanguine et en contournant le foie, soit indirectement lors d'une surcharge des capacités d'élimination du foie (Fischer et Dietrich 2000).

#### *1.3.2.3 Effets biochimiques des microcystines sur le poisson*

Une fois intégrées dans les cellules, les MCs interagissent avec de nombreuses molécules cibles entraînant de nombreuses altérations fonctionnelles. Ainsi, la toxicité des MCs vis-à-vis des poissons est principalement due à quatre interactions moléculaires : l'inhibition des PPs et des



ATPases, la formation d'espèces réactives de l'oxygène entraînant un état de stress oxydatif, et des effets sur les processus de détoxification et notamment sur la voie de détoxification impliquant le glutathion (Figure 10).

Pour les poissons comme pour les autres organismes, les PP sont les cibles principales des MCs (Råbergh et al., 1991). L'inhibition des PP intervient en quelques heures et semble relativement stable dès lors que le poisson reste en contact avec des MCs (Tencalla et Dietrich, 1997; Malbrouck et al., 2004; Deng et al., 2010). Cependant l'activité et le temps d'inhibition des PP semblent tributaires de l'état nutritionnel et par conséquent physiologique des organismes exposés mais également du variant de la microcystine à l'origine de l'inhibition (Xu et al., 2000; Malbrouck et al., 2004).

De plus, les MCs sont également capables de se fixer aux ATPases (Mikhailov et al., 2003). Les ATPases sont des enzymes membranaires, qui en synthétisant ou en hydrolysant les molécules d'ATP, sont responsables du transfert des ions à travers la membrane plasmique et donc de l'équilibre ionique des cellules. Chez le poisson, le lien direct entre microcystine et inhibition des ATPases n'est pas clair. En effet, des études semblent montrer l'inhibition par les MCs des  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPases présentes dans les branchies de carpes (*Cyprinus carpio*) entraînant des dysfonctionnements importants au niveau de ces organes (Gaete et al., 1994; Zambrano et Canelo, 1996) alors que Malbrouck et al. (2003) n'ont observé aucun effet sur ces mêmes enzymes chez le cyprin doré (*Carassius auratus*).

L'apparition de ROS<sup>2</sup> chez les organismes aquatiques n'est pas rare à la suite d'une exposition aux MCs (Amado et Monserrat, 2010). Cette augmentation des concentrations en ROS peut être attribuée à la fois à une diminution du glutathion cytosolique, première ligne de défense face au ROS, entraînant toute une cascade de perturbations intracellulaires notamment au niveau du fonctionnement des mitochondries favorisant la production des ROS, mais aussi à l'hyperphosphorylation induite par la fixation des MCs aux PP favorisant la diminution du glutathion et ainsi la capacité de détoxification des cellules (Prieto et al., 2007; Amado et Monserrat, 2010). Dans la cellule, les ROS oxydent les molécules intracellulaires et par conséquent entraînent des inhibitions enzymatiques, la peroxydation des lipides ainsi que des dommages à l'ADN à l'origine de nombreux dommages cellulaires impliqués dans l'apoptose des

---

<sup>2</sup> Radicaux libres ou molécules d'origine exogène ou endogène, rendus chimiquement très réactifs (présence d'électrons non appariés) qui jouent un rôle important dans la communication intercellulaire mais dont l'augmentation des concentrations en périodes de stress entraîne des dommages cytologiques.

cellules (Amado et Monserrat, 2010). Ainsi, le stress oxydatif provoqué par l'exposition des poissons aux MCs a été observé *via* des modifications quantitatives des enzymes du système antioxydant (Jos et al., 2005; Prieto et al., 2007; Zhao et al., 2011; Pavagadhi et al., 2012), *via* une augmentation de la concentration en ROS (Zhang et al., 2007; Li et Xie, 2009; Jiang et al., 2011) ou encore *via* l'augmentation des produits issus de la peroxydation des lipides (Prieto et al., 2006, 2007, 2009; Atencio et al., 2008). Cependant, d'après ces études, les effets des MCs sur le stress oxydatif varient en fonction du temps d'exposition, de la dose d'exposition du tissu étudié et également en fonction de l'espèce étudiée (Amado et Monserrat, 2010).

La voie du glutathion dans la détoxification des ROS et des MCs est particulièrement importante (Pflugmacher et al., 1998; Campos et Vasconcelos, 2010). Lors des processus de détoxification, le glutathion joue le rôle de substrat qui permettra de conjuguer les molécules et notamment les MCs, à détoxifier et excréter, par l'intermédiaire d'une enzyme la glutathion S-transférase (GST). Cependant, contrairement aux enzymes antioxydative, la voie de détoxification utilisant le glutathion semble répondre de manière non homogène lors d'une exposition des poissons aux MCs. Ainsi, la réponse de la GST suite à l'exposition des poissons aux MCs n'est pas uniforme. De nombreux auteurs ont montré une augmentation de l'activité de la GST mais aussi de l'expression de l'ARN messager de la GST après un contact avec la microcystine (Wiegand et al., 1999; Fu et Xie, 2006; Liang et al., 2007; Li et al., 2010; Jiang et al., 2012). En revanche, d'autres auteurs ont observé une diminution (Malbrouck et al., 2003; Cazenave et al., 2006a; Liang et al., 2007) ou aucun effet (Malbrouck et al., 2004) des MCs sur l'activité de la GST. De plus, la réponse de la GST aux MCs semble dépendante de l'espèce de poisson, de la dose d'exposition, du temps d'exposition et enfin de l'isoforme de la GST impliquée (Cazenave et al., 2006a; Qiu et al., 2007; Liang et al., 2007).

#### *1.3.2.4 Effets des microcystines sur les stades embryo-larvaires*

Les différents stades embryonnaires ou larvaires des poissons sont considérés comme plus sensibles que les stades juvéniles ou adultes face à une exposition à des composés toxiques (Wiegand et al., 1999). De plus, la mobilité limitée, voire inexistante, de ces stades de vie diminue leur capacité d'évitement lors d'expositions à des cyanobactéries et des cyanotoxines. Ainsi, suite à de telles expositions toxiques, des perturbations importantes dans les processus de développement, entraînant la mort des embryons et des larves, peuvent alors apparaître et

provoquer des effets négatifs sur la dynamique des communautés et des populations de poissons. Lors d'une exposition de ces jeunes stades de vie aux MCs, les processus de développement ainsi que le fonctionnement des organes sont perturbés (Malbrouck et Kestemont, 2006). Les études réalisées sur les processus d'éclosion des embryons révèlent que, sous l'effet des MCs, le succès d'éclosion est diminué et le temps à l'éclosion est avancé ou retardé avec des délais dépendant du temps d'exposition mais aussi des variants et des doses de MCs utilisées (Oberemm et al., 1999; Ernst et al., 2001; Liu et al., 2002; Jacquet et al., 2004). Concernant la survie des embryons et des larves, différents auteurs ont pu mettre en avant les effets négatifs des MCs sur ce paramètre. Ainsi, des diminutions significatives de la survie des embryons et des larves en présence de MCs ont été observées (Oberemm et al., 1999; Jacquet et al., 2004; Deng et al., 2010). Cependant les mortalités de ces jeunes stades de vie semblent dépendantes à la fois du stade de développement (Liu et al., 2002), mais aussi de la dose de toxine et du temps d'exposition (Wang et al., 2005). De plus, la croissance des larves semblent également impactée négativement lors d'une pré-exposition des embryons ou d'une exposition des larves de poissons aux MCs *via* leur nourriture (El Ghazali et al., 2009, 2010a; b). Par ailleurs, d'importantes modifications histologiques et ontogéniques sont observées lors d'une exposition des embryons et des larves de poissons aux MCs. Ainsi des anomalies importantes de la morphologie et de la résorption du sac vitellin, de la morphologie générale de l'organisme telle qu'une taille de tête diminuée, des courbures du corps et de la queue et enfin des perturbations histologiques et fonctionnelles du système hépatique, digestif et cardiaque souvent à l'origine de fortes mortalités des organismes ont pu être observées expérimentalement et *in-situ* (Oberemm et al., 1999; Ernst et al., 2001; Liu et al., 2002; Jacquet et al., 2004; Huynh-Delerme et al., 2005; Malbrouck et Kestemont, 2006). Cependant, face à l'assimilation des MCs, l'activation des différentes enzymes constitutives du système de détoxification des organismes, telles que la GST, la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPx), la peroxydase (POD), a pu être observée (Wiegand et al., 1999; Malbrouck et Kestemont, 2006; Cazenave et al., 2006b) avec cependant des effets variables en fonction du stade ontogénique et des différents variants des MCs (Malbrouck et Kestemont 2006). L'activation des enzymes de détoxification à la suite d'une exposition aux MCs suggère que les jeunes stades de vie ont la capacité de métaboliser les MCs en des composés moins toxiques. Cependant la détoxification des MCs nécessite un apport d'énergie dont la croissance de l'organisme ne pourra pas bénéficier. Ainsi, le bénéfice engendré par la détoxification des composés toxiques pourra

donc être contrebalancé par des effets négatifs notamment sur la croissance et le développement des organismes exposés (Cazenave et al. 2006b).

Les études réalisées sur les jeunes stades de vie des poissons sont généralement expérimentales et utilisent des modes d'exposition et des concentrations en MCs souvent peu réalistes. Cependant, en milieu naturel, les organismes peuvent être exposés de façon chronique aux cyanobactéries et leurs composés toxiques dont les MCs. Best et al. (2002) ont pu observer les effets négatifs d'autres composés toxiques que les MCs, les LPS, sur le système de détoxification des poissons. Ces observations laissent supposer qu'en milieu naturel les poissons sont soumis à un mélange de composés toxiques capables d'agir de manière synergique et d'impacter les embryons et les larves de poissons de manière significative et ainsi potentiellement de contribuer à l'accumulation des cyanotoxines et par conséquent à des perturbations importantes des dynamiques de populations de ces organismes (Wiegand et al., 1999; El Ghazali et al., 2010a; b).

#### *1.3.2.5 Effets des microcystines sur les poissons juvéniles et adultes*

Les effets des MCs sur les stades juvéniles et adultes de poisson ont été principalement étudiés expérimentalement avec des modes d'exposition pouvant être éloignés de la réalité du milieu naturel et expliquer des effets différents sur une même espèce (Malbrouck et Kestemont, 2006). En milieu naturel, les poissons sont principalement exposés aux MCs *via* leur immersion dans de l'eau contaminée ou *via* leur nourriture. Ces expositions naturelles sont souvent associées à l'accumulation des MCs et à des dommages histologiques importants dans différents organes (Malbrouck et Kestemont, 2006). Ainsi, la majorité des études, qu'elles soient expérimentales ou *in-situ*, montrent qu'à la suite d'une exposition aux MCs, les toxines sont principalement retrouvées dans l'intestin et le foie, puis en moindres concentrations dans les reins, les branchies, le cerveau, les ovaires, les fèces mais également dans les muscles des poissons juvéniles et adultes, ce qui pourrait constituer une voie de contamination potentielle pour l'homme, bien qu'à ce jour et à ma connaissance aucune intoxication n'est été observée à la suite de consommations de poissons contenant des MCs (Soares et al., 2004; Malbrouck et Kestemont, 2006; Deblois et al., 2008; Papadimitriou et al., 2010; Dyble et al., 2011). Cependant, l'accumulation des MCs dans les muscles de poissons ne semble pas évidente dans toutes les situations et semble dépendre du variant de MCs ingéré par le poisson. Xie et al. (2004) ont pu observer une accumulation de la MC-RR dans les muscles de la carpe argentée mais en revanche aucune trace de MC-LR malgré

sa présence dans d'autres organes. Ces résultats suggèrent qu'il existe probablement des différences de biodisponibilité entre les différents variants de MCs assimilés. Par ailleurs, l'état nutritionnel des poissons semble jouer un rôle important dans les cinétiques d'accumulation et de détoxification des MCs. Ainsi, les poissons nourris semblent moins sujets à l'accumulation des MCs que des poissons ayant jeuné (Malbrouck et al., 2004). Lors des mesures d'accumulation des MCs dans les organes de poissons, un intérêt tout particulier doit être porté sur la méthode d'extraction. En effet, une fois assimilées, les MCs se complexent rapidement et de manière non covalente au PPs puis par la suite de manière covalente à ces même protéines (Neffling et al., 2010). La majorité des études n'évalue que la partie libre des MCs accumulées et non la partie liée de manière covalente et donc plus difficilement extractible (Malbrouck et Kestemont, 2006; Neffling et al., 2010). Ainsi, les concentrations en MCs mesurées dans ces études sont donc sous-évaluées et probablement peu représentatives de la quantité réelle de MCs accumulée. Williams et al. (1997) estiment à environ 24% la quantité de microcystine libre et mesurable chez le saumon. Par conséquent, l'absence de MCs dans des poissons exposés aux cyanobactéries et à leurs cyanotoxines peut être expliquée à la fois par une activité de détoxification et d'excrétion supérieure à l'assimilation des MCs mais également par la méthodologie d'analyse.

En outre, les MCs peuvent provoquer des changements physiologiques, histologiques et comportementaux majeurs lorsqu'elles sont assimilées par les poissons. Dans la littérature, l'étude des indices sanguins tels que l'aspartate aminotransférase (AspAT), l'alanine aminotransférase (AlaAT) et la lactate déshydrogénase (LDH) est fréquente. L'augmentation de l'activité de ces enzymes peut révéler des altérations tissulaires au sein des organismes exposés sans pour autant situer l'emplacement de ces altérations. Lors d'une exposition des poissons aux MCs, l'activité de ces enzymes augmente avec toutefois des différences notables qui semblent dépendre du mode d'administration et de la quantité de toxine mais également de l'espèce de poisson étudiée (Bury et al., 1997; Kopp et Hetesa, 2000; Malbrouck et al., 2003; Li et al., 2004; Malbrouck et Kestemont 2006). Parallèlement à cela, de nombreux auteurs ont également focalisés leurs études expérimentales sur les effets histologiques des MCs sur les poissons à la suite de gavages, d'injections intrapéritonéales et d'immersions. En dépit du fait que les réponses des organismes aux MCs soient dépendantes des doses de MCs et du temps d'exposition des poissons (Malbrouck et Kestemont, 2006), les MCs entraînent des changements structuraux majeurs dans le foie, l'intestin, les reins, les branchies, le cœur mais également les gonades des

organismes intoxiqués, entraînant des dysfonctionnements fonctionnels importants de ces organes qui à court terme peuvent provoquer la mort des organismes (Carbis et al., 1996; Ernst et al., 2006, 2007; Atencio et al., 2008; Li et Xie, 2009; Djediat et al., 2011; Trinchet et al., 2011; Marie et al., 2012). Cependant, des différences de sensibilité aux MCs existent entre les espèces de poisson (Bury et al., 1997; Fischer et Dietrich, 2000). Fischer et Dietrich (2000) ont observé, chez les cyprinidés, des dommages histologiques et des mortalités plus importantes que chez les salmonidés et ceci pour des doses de toxines et des modes d'administration identiques. Ceci pourrait être lié à une plus forte assimilation des MCs par les cyprinidés. Par ailleurs, les effets histologiques des MCs, tributaires du mode d'administration de la toxine, semblent plus importants à la suite d'injections intrapéritonéales que par gavage et immersion (Carbis et al., 1996). En plus des effets physiologiques des MCs, celles-ci sont capables de provoquer des modifications comportementales chez le poisson telles qu'une augmentation de la mobilité diurne quand les concentrations en MCs restent basses ou moyennes (0.5 à 5 µg/L), et, lorsque les concentrations en MCs sont élevées (50 µg/L), une diminution de la mobilité diurne, de l'activité et du succès de reproduction et une activité nocturne accrue. Tous ces changements peuvent, en milieu naturel, occasionner d'importantes perturbations notamment du cycle circadien des poissons et ainsi entraîner des troubles dans les processus d'alimentation et de reproduction des espèces piscicoles (Baganz et al., 1998, 2004; Cazenave et al., 2008). Plus récemment des phénomènes de génotoxicité des MCs ont pu être mis en évidence par différents auteurs principalement chez les mammifères (Zegura et al., 2011). Chez les poissons, des études récentes ont permis d'observer des dommages à l'ADN apparaissant rapidement après l'exposition de tilapia aux MCs (par injections et immersion) (Da Silva et al., 2011). De la même manière, des dommages à l'ADN ont été aussi observés chez la carpe commune soumise par immersion à un extrait naturel de cyanobactérie contenant à la fois des MCs mais également d'autres composés toxiques (Wu et al., 2011).

Cependant pour faire face aux effets adverses des MCs, les poissons possèdent un système de détoxification complexe qui a pour but de métaboliser ces toxines en des composés moins toxiques pour qu'ensuite ils soient excrétés. Les différentes études réalisées à ce sujet montrent des effets variables en fonction des doses, du temps d'exposition mais aussi des espèces utilisées lors de ces travaux (Amado et Monserrat, 2010). Kondo et al. (1992) a été le premier à démontrer la conjugaison des MCs avec le GSH et la cystéine (Cys) lors des processus de détoxification.

Les GSTs, responsables de la conjugaison des MCs avec le GSH, sont les enzymes les plus étudiées dans les phénomènes de biotransformation des MCs (Pflugmacher et al., 1998; Amado et Monserrat, 2010). Cependant, plusieurs études mettent en avant des différences de réponse de l'activité et de la transcription des GSTs ainsi que des différences de concentrations en GSH suite à l'exposition des organismes aux MCs. Ainsi, les MCs peuvent à la fois entraîner une augmentation (Blaha et al., 2004), une diminution (Li et al., 2003) et plus souvent aucun changement des niveaux de GSH dans les poissons exposés aux MCs (Malbrouck et al., 2004; Li et al., 2007a, 2010; Qiu et al., 2007; Atencio et al., 2008). La même variabilité de réponse est observée lors de l'étude de l'influence des MCs sur l'activité et la transcription des GST. Plusieurs études mettent en avant l'augmentation de l'activité et de la quantité de transcrits des différentes isoformes de la GST lors d'une exposition des poissons aux MCs (Fu et Xie, 2006; Li et al., 2007b, 2010; Cazenave et al., 2008). En revanche, d'autres études semblent observer une diminution de l'activité GST (Malbrouck et al., 2003; Cazenave et al., 2006a; Li et al., 2008) ou aucun effet (Li et al., 2003; Malbrouck et al., 2004) suite à une contamination de poissons aux MCs. De plus, des différences de transcriptions et des différences d'activité des GSTs entre les espèces de poissons démontrent que toutes les espèces ne possèdent pas les mêmes capacités de détoxification et par conséquent la même tolérance aux MCs (Liang et al., 2007; Setlikova et Wiegand, 2009). Récemment, les études approfondies des différents composés conjugués des MCs ont observé que les formes conjuguées des MCs avec la Cys étaient présentes en quantités plus importantes que les formes conjuguées avec le GSH traduisant un rôle important de la conjugaison des MCs aux Cys dans les processus de détoxification (Zhang et al., 2009, 2012; He et al., 2012).

Il existe un lien non équivoque entre la présence de MCs et les perturbations physiologiques, comportementales et histologiques importantes observées chez les différents stades ontogéniques de poissons. Cependant l'intensité des effets causés par les MCs sur les poissons dépend à la fois des espèces, des concentrations en MCs auxquelles elles sont soumises, mais également du temps et du mode d'exposition de ces espèces aux MCs. Ainsi, dans les eaux douces, les impacts des cyanobactéries sur les poissons semblent, par conséquent, fortement variables et dépendants de la quantité de MCs assimilée mais également de la quantité détoxifiée et excrétée. Néanmoins, la présence des cyanobactéries et des cyanotoxines dans les milieux est très souvent associée à des

perturbations importantes tant dans le fonctionnement que dans la structure des réseaux trophiques aquatiques dulçaquicoles.



## 2 Chapitre introductif

### 2.1 Occurrence de *Planktothrix rubescens*

Partout dans le monde, l'eutrophisation anthropique des écosystèmes aquatiques a fortement contribué aux nombreuses altérations structurelles et fonctionnelles de ces milieux (Smith et Schindler, 2009). Conséquence ubiquiste de ce phénomène d'eutrophisation, la présence de cyanobactéries toxiques est l'une des causes principales des perturbations écosystémiques des milieux dulçaquicoles eutrophisés (Heisler et al., 2008; Smith et Schindler, 2009; O'Neil et al., 2012). En effet, l'augmentation de la charge interne en nutriments associée au réchauffement climatique tend à favoriser les occurrences de nombreux genres de cyanobactéries capables de produire divers composés toxiques responsables de perturbations écologiques, économiques et sanitaires (Paerl et Huisman, 2009; Paerl et Paul, 2011; O'Neil et al., 2012). Ainsi, dans un contexte de réchauffement climatique global, supposé favoriser l'apparition et le développement des blooms, la présence de cyanobactéries devient un problème majeur en termes d'usage et de gestion de la qualité des eaux douces.

Au cours de la seconde partie du 20<sup>ème</sup> siècle, les concentrations en nutriment des lacs péri-alpins n'ont cessé d'augmenter suite à l'essor industriel et démographique environnant. Néanmoins, dès les années 70, les efforts de restauration impliquant d'importantes mesures de détournement et de traitement des eaux polluées, ont permis de diminuer les concentrations en phosphore inorganique dissous de ces grands lacs (Dokulil et Teubner, 2005; Gerdeaux et al., 2006). Malgré la diminution drastique de la charge interne de phosphore et par conséquent le retour progressif de ces lacs à un statut trophique mésotrophe voir oligotrophe, une cyanobactérie toxique, *Planktothrix rubescens*, se développe et forme des efflorescences estivales importantes dans le métalimnion de certain de ces lacs. *Planktothrix rubescens* est l'espèce de cyanobactérie la plus fréquemment rencontrée dans les lacs profonds du Nord de l'Europe ainsi que dans les lacs mésotrophes et oligotrophes des régions péri-alpines où elle forme fréquemment d'importantes efflorescences à l'origine de perturbations économiques et écologiques majeures (Chorus et Bartram, 1999; Vareli et al., 2009).

## 2.2 *Planktothrix rubescens* : avantages compétitifs et toxicité

*Planktothrix rubescens* est présente et forme fréquemment des efflorescences estivales dans les lacs péri-alpins français (Jann-Para et al., 2004; Jacquet et al., 2005), suisses (Walsby et al., 2006; Baumann et Jüttner, 2008; Van den Wyngaert et al., 2011), italiens (Legnani et al., 2005; Salmaso, 2010; D'alelio et al., 2011), autrichiens (Kurmayer et al., 2011; Dokulil et Teubner, 2012) et allemands (Fastner et al., 1999; Ernst, et al. 2009). C'est une cyanobactérie planctonique filamenteuse adaptée principalement aux lacs mésotrophes profonds possédant une stratification thermique saisonnière stable. Cette cyanobactérie forme des efflorescences dans la couche métalimnique plus particulièrement pendant les étés et les automnes. Grace à la présence d'un appareil photosynthétique complet, riche en pigments accessoires, l'allophycocyanine, la phycocyanine et la phycoérythrine, *P. rubescens* est capable d'avoir une activité photosynthétique importante en interceptant le spectre complet (400-700nm) du rayonnement photosynthétique actif (PAR) incident (Micheletti et al., 1998; Walsby et al., 2001). Ainsi, même lors de très faibles valeurs d'irradiance, la photosynthèse réalisée par cette espèce reste active alors que lors de conditions de fortes irradiances, des phénomènes de photoinhibition ont pu être observés (Chorus et Bartram, 1999; Oberhaus et al., 2007). De plus, de par leur ratio surface/volume élevé inhérent à leur forme filamenteuse, l'efficacité d'interception du PAR est augmentée et permet à *P. rubescens* d'accroître son efficacité à capter la lumière et de rester performante même sous de faibles intensités lumineuses (Naselli-Flores et al., 2007). De ce fait, à la profondeur du pic de *P. rubescens* où environ 1 à 5 % du PAR incident est reçu, la quasi-totalité de la lumière perçue est utilisée par la cyanobactérie, ce qui pourrait inhiber la croissance et mettre hors de compétition les autres taxa phytoplanctoniques potentiellement présents dans le métalimnion et les couches inférieures (Feuillade, 1994). En complément de l'appareil photosynthétique complet qu'elle possède, *P. rubescens* dispose également d'un système de flottaison, combinant la présence de vésicules à gaz à l'accumulation/dégradation des carbohydrates, qui lui permet d'adapter sa position dans la colonne d'eau en fonction des conditions lumineuses et des concentrations en nutriments (Brookes et Ganf, 2001; Walsby, 2005). Lors de la stratification thermique estivale des lacs, la position métalimnique de la cyanobactérie, favorable à son développement, est maintenue grâce une faible régulation de la flottabilité (Walsby et al. 2001). Par ailleurs, *P. rubescens* est capable d'excréter des

phosphatases alcalines afin d'utiliser les formes organiques du phosphore lorsque les conditions en phosphore inorganique sont limitantes (Feuillade, 1994). La production de ces enzymes peut en partie expliquer la présence de *P. rubescens* dans les lacs où les concentrations en phosphore inorganique sont faibles ( $< 10 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) (Feuillade et al., 1990) et lui confère un avantage compétitif par rapport aux autres taxa phytoplanctoniques. De plus, l'assimilation d'acides aminés est favorisée lors de conditions de faible irradiance chez *P. rubescens* et pourrait être un mécanisme supportant la croissance des filaments dans le métalimnion (Walsby et Jüttner, 2006). Ainsi, *P. rubescens* est capable de croître par hétérotrophie, ce qui permet de supplémer la croissance par autotrophie dans des environnements recevant de faibles irradiances comme le métalimnion (Dokulil et Teubner, 2012). Pendant cette période stratifiée, des variations de la position verticale de *P. rubescens* dans le métalimnion, parfois supérieure à 10 mètres, peuvent être observées à l'échelle journalière sous l'effet d'ondes internes (ondulations de couches d'eau de densités différentes suite à des périodes de vent) (Cuypers et al., 2011). Ce phénomène, en influençant la profondeur du pic de *P. rubescens* et par conséquent la quantité de lumière reçue par la cyanobactérie, pourrait ainsi influencer la croissance de cette espèce (Cuypers et al., 2011). Au cours de la période de brassage, les filaments de *P. rubescens* sont répartis dans toute la colonne d'eau mais généralement plus concentrés dans la partie supérieure de la zone euphotique où ils peuvent former des nappes et des écumes de couleur rouge à la surface de l'eau, phénomène appelé parfois « Sang des bourguignons » (Walsby et al., 2006). Pendant l'hiver, les abondances de *P. rubescens* diminuent fortement. Cependant, une partie des filaments reste viable et constitue un *inoculum* actif plus tôt au cours de la saison (en comparaison des autres taxons phytoplanctoniques), ce qui donnera un avantage compétitif à la cyanobactérie dans l'utilisation de la ressource au printemps suivant (Walsby et al., 1998; Dokulil et Teubner, 2012).

Comme de nombreux genres de cyanobactérie présents dans les écosystèmes d'eau douce, *P. rubescens* a la capacité de produire une variété importante de composés toxiques et notamment les microcystines. Ces hépatotoxines sont fréquemment rencontrées et associées aux genres de cyanobactéries formant des efflorescences et sont probablement les cyanotoxines les plus étudiées à l'heure actuelle (Codd et al., 2005; Martins et Vasconcelos, 2009). En effet, *P. rubescens* produit majoritairement de la MC-RR et de la MC-LR ainsi que leurs analogues méthylés et déméthylés respectifs (Blom et al., 2001; Albay et al., 2003; Jann-Para et al., 2004; Briand et al., 2005; Blom et Jüttner, 2005; Ernst et al., 2009; Vareli et al., 2009). Cependant dans

le milieu naturel, principalement lorsque les densités de filaments de *P. rubescens* deviennent importantes, les gènes impliqués dans la production des MCs peuvent être inactivés *via* des mutations et la production de toxine stoppée (Kurmayer et al., 2004; Ostermaier et Kurmayer, 2009).

Le rôle des ces composés toxiques est encore mal connu. Cependant, ces molécules ont la capacité d'interagir, généralement de manière négative, avec tous les compartiments trophiques des écosystèmes dulçaquicoles (Granéli et al., 2008; Martins et Vasconcelos, 2009).

## **2.3 Effets de *P. rubescens* et des microcystines dans les écosystèmes lacustres**

Comme pour tous les autres genres de cyanobactéries, lorsque *P. rubescens* peuple un milieu, des conséquences écosystémiques négatives apparaissent. Le succès de développement de *P. rubescens* dans les lacs péri-alpins provient de l'utilisation optimale des conditions du milieu (nutriments, température, lumière) grâce aux divers adaptations physio-écologiques qu'elle possède mais également à sa forme filamenteuse et à sa toxicité qui limitent le contrôle de son développement par les facteurs de régulation Top-Down (Dokulil et Teubner, 2000, 2012).

A ce jour, peu d'études ont été réalisées sur les interactions existantes entre *P. rubescens* et le compartiment zooplanctonique et notamment les cladocères qui constituent un lien important entre les producteurs primaires et les poissons. Les filaments de *P. rubescens* constituent *a priori* une ressource alimentaire difficilement exploitable et de qualité limitée pour le zooplancton. En effet, en consommant des filaments de *P. rubescens*, le zooplancton absorbe des molécules toxiques et s'expose à des effets néfastes. La présence d'inhibiteurs de phosphatase comme les microcystines et d'inhibiteurs de protéases comme les micropeptides, les anabaenopeptides, les microginines et les aeruginosines impacte négativement la survie du zooplancton (Blom et al. 2001, 2006; Grach-Pogrebinsky et al., 2003; Rohrlack et al., 2005b). De plus, des mortalités massives de daphnies, dont la cause exacte reste difficile à élucider, ont notamment pu être observées en milieu naturel lors d'un bloom de *P. rubescens* (Baumann et Jüttner 2008). Cependant, ces mortalités massives de daphnies restent des phénomènes rares et d'autres études semblent montrer que la consommation des filaments de *P. rubescens* par le zooplancton ne semble pas toujours causer des effets aussi radicaux. Oberhaus et al. (2007b) ont constaté

expérimentalement que les filaments de *P. rubescens*, préférentiellement ceux de petites tailles, pouvaient être ingérés par *Daphnia* même si les taux observés étaient largement inférieures à ceux mesurés lors du broutage de chlorophycées rondes et non toxiques. Ainsi, malgré les contraintes de taille et de toxicité que représente la consommation de *P. rubescens* pour la daphnie, la cyanobactérie peut constituer une ressource alimentaire pour le zooplancton notamment en période de bloom (Kurmayer et Juttner, 1999). L'étude réalisée par Kurmayer et Juttner (1999) montre que *Daphnia* est présente lors des blooms de *P. rubescens* et qu'elle exerce une importante pression de broutage sur la cyanobactérie. Expérimentalement, ces auteurs ont montré qu'en présence de *P. rubescens*, les taux de survie de *Daphnia* étaient significativement plus importants qu'en condition de jeûne ou qu'avec une autre cyanobactérie. De plus, les taux de filtrations des daphnies observés en présence de *P. rubescens* contenant aucune toxine, étaient aussi élevés qu'en présence de cryptophycées. Ces résultats semblent suggérer que les daphnies seraient capables d'adapter la quantité de *P. rubescens* ingérée afin d'éviter au mieux les effets négatifs des toxines présentes. Ainsi en milieu naturel, les filaments de *P. rubescens* pourraient être ingérés, les toxines accumulées et transportées au sein des réseaux trophiques par les daphnies.

Les poissons, maillon supérieur des réseaux trophiques, devraient, par l'ingestion de filaments de *P. rubescens* et/ou de daphnies ayant consommé ces cyanobactéries, ingérer des cyanotoxines et notamment des microcystines. La composition piscicole des lacs péri-alpins est caractéristique des milieux en cours de ré-oligotrophisation avec une dominance des corégonidés et encore une présence importante des cyprinidés et des percidés, bien que la biomasse de ces 2 derniers tende à diminuer avec la diminution de la charge en phosphore des lacs (Gerdeaux et al., 2006). Les corégonidés et les percidés sont des espèces clés des lacs péri-alpins qui ont une forte valeur économique, écologique et récréationnelle dans les régions péri-alpines où ces poissons sont pêchés et consommés. Malgré cela, peu d'études ont été réalisées quant aux impacts possibles de *P. rubescens* et ses toxines sur ces espèces piscicoles. Seuls des travaux sur les corégones ont été réalisés au cours des années 2000 (Ernst et al., 2001, 2006, 2007). En période de bloom, des filaments de *P. rubescens* et des concentrations importantes en MCs ont été retrouvés dans les intestins de corégones (*Coregonus lavaretus*) (Ernst et al., 2001). Dans la même étude, des dommages histologiques dans les tissus intestinaux ont été observés et des malformations ainsi que des mortalités importantes des embryons et des larves ont été décelées. Ces résultats

suggèrent qu'en condition de bloom, les corégones zooplanctonophages, ingèrent au cours de leurs prises alimentaires, des filaments de *P. rubescens* et du zooplancton, probablement contaminé, et ainsi ils se trouvent exposés aux effets des toxines et notamment des MCs. Les œufs et les larves présents dans l'eau contenant des filaments de *P. rubescens* et des microcystines se trouvent également impactés par la cyanobactérie. Expérimentalement, les effets physiologiques et histologiques de *P. rubescens* sur le corégone ont également été investigués par ces mêmes auteurs. Une quantité de *P. rubescens* équivalente à la quantité qui peut être ingérée par le corégone en 4 à 8 jours a été administrée oralement à des corégones d'une année. Les signes d'un stress physiologique comme une augmentation du rythme cardiaque, une augmentation du glucose plasmatique et une nage perturbée ont pu être observés sur les corégones exposés (Ernst et al., 2006). De plus, des changements histologiques importants au niveau du foie et du tractus gastro-intestinal ainsi que la présence de MCs dans ces mêmes organes et dans les reins ont été constatés (Ernst et al., 2006). Ainsi, ces résultats démontrent que l'ingestion de filaments de *P. rubescens* par le corégone entraîne des perturbations physiologiques et histologiques importantes dues à la présence des MCs qui peuvent expliquer des perturbations des populations de corégonidés lors des blooms. Par ailleurs, les effets de la présence de *P. rubescens* à des concentrations faibles, moyennes et semblables à celle d'un bloom sur les corégones ont également été étudiés expérimentalement (Ernst et al., 2007). Les taux de mortalité les plus élevés ont été observés pour les concentrations en *P. rubescens* les plus fortes. Des changements radicaux dans les taux de ventilation traduisant un état de stress physiologique ont également été remarqués, dès la deuxième semaine, pour tous les poissons exposés aux différentes concentrations en *P. rubescens*. Des effets histologiques et la présence de MCs ont également été observés dans le foie, les reins et le tractus gastro-intestinal alors que seul des changements histologiques ont pu être observés dans les branchies. Ce résultat suggère que les dommages au niveau des branchies proviennent de l'abrasion mécanique liée à la présence des filaments de la cyanobactérie ainsi que de l'irritation due à l'infection parasitaire. Cette étude met en avant le fait que même à faibles concentrations, l'exposition chronique des corégones à *P. rubescens* et aux MCs provoque un état de stress physiologique et des dommages tissulaires importants pouvant provoquer la mort des organismes (Ernst et al., 2007). A ce jour, ces études sont les seules à investiguer les effets de *P. rubescens* sur le corégone. Par ailleurs, aucune étude n'a été réalisée quant aux effets de cette cyanobactérie sur les populations de perches (*Perca*

*fluviatilis*). Ce travail de thèse s'inscrit donc dans la continuité de ces études et a pour but d'améliorer et de compléter les connaissances concernant les effets de *P. rubescens* sur les communautés piscicoles des lacs péri-alpins.

## 2.4 Contexte de l'étude et questionnement scientifique

Le lac du Bourget et lac d'Hallwil sont deux lacs contrastés à la fois par leurs statuts trophiques, l'un étant oligo-mésotrophe et l'autre méso-eutrophe respectivement et également de par leur taille. Le lac du Bourget est un lac de 42 km<sup>2</sup> de superficie dont la profondeur moyenne est de 80 mètres, et la profondeur maximale de 145 mètres (Briand et al., 2005). Le lac d'Hallwil quant à lui s'étend sur 10.3 km<sup>2</sup> avec une profondeur moyenne de 28.5 m et une profondeur maximale atteignant les 48 m (Arter, 1989). Dans ces deux lacs, les abondances de perches (*Perca fluviatilis*), notamment des juvéniles, et de corégones (*Coregonus lavaretus* dans le lac du Bourget et *Coregonus suidteri* dans le lac d'Hallwil) sont importantes et leurs valeurs commerciales reconnues. Les juvéniles de perche et les corégones sont tous deux présents dans la zone pélagique avec cependant des préférences thermiques différents expliquant les répartitions spatiales distinctes entre les deux espèces. Les juvéniles de perche se situent au dessus de la thermocline dans l'épilimnion où la température de l'eau varie entre 16 et 26 °C (Wang et Eckmann, 1994 ; Guillard et al., 2006). A l'inverse, les corégones se situent en dessous de la thermocline, à la frontière entre le métalimnion et l'hypolimnion, dans des eaux où la température varie généralement de 4 à 10 °C (Mehner et al., 2010). Les deux lacs ont traversé une période d'eutrophisation puis de ré-oligotrophisation qui s'accompagne de l'occurrence récurrente des blooms de *P. rubescens*. Ainsi, on peut supposer que de par leurs répartitions spatiales verticales distinctes, les juvéniles de perche et les corégones ne seront pas impactés de la même manière par la présence de *P. rubescens*. En effet les juvéniles de perche situés dans l'épilimnion et donc au dessus du métalimnion où les blooms de *P. rubescens* sont présents, ne devraient pas ou peu être impactés par la présence de la cyanobactérie contrairement aux corégones qui eux sont situés dans le métalimnion. Cependant malgré les effets négatifs connus des cyanobactéries sur le fonctionnement et la structure des écosystèmes, il n'existe que très peu d'études concernant les effets de *P. rubescens* sur le compartiment piscicole des écosystèmes péri-alpins.

Ce travail de thèse se propose donc de mettre en évidence les voies de transfert des MCs au sein

des lacs péri-alpins et d'évaluer les réponses physiologiques des poissons contaminés par ces toxines. La première partie du travail (**chapitre III**) sera consacrée à l'étude des effets de la cyanobactérie sur le corégone. La dynamique estivale des abondances de *P. rubescens* et en parallèle, la position et l'abondance des corégones seront analysées afin de mettre en avant d'éventuels comportements d'évitement des blooms *via* des migrations spatiales et l'impact que ceci peut avoir sur l'accumulation des MCs dans les organes des corégones (**Article 1**). Puis les processus d'accumulation et de détoxification ainsi que les effets génotoxiques des MCs sur des corégones gavés avec des concentrations pertinentes en MCs, c'est-à-dire proches de celles potentiellement ingérées par les corégones en une journée *via* la consommation de zooplancton seront étudiés. Il s'agira d'évaluer si les corégones peuvent être impactés par de faibles apports en MCs (proches de ceux potentiellement ingérés par le corégone en une journée *via* la consommation de zooplancton) et de savoir si des effets négatifs sur l'ADN peuvent apparaître. Les résultats seront utilisés afin d'expliquer de potentielles perturbations des populations de cette espèce lors des blooms (**Article 2**).

La seconde partie du travail de thèse se consacrera, en couplant approche *in-situ* et expérimentale, à l'étude des effets physiologiques de la cyanobactérie sur les juvéniles de perche et à l'identification des voies potentielles de contamination (**chapitre IV**). Par une approche *in-situ*, la dynamique saisonnière d'accumulation des MCs dans les juvéniles de perche sera étudiée, le régime alimentaire saisonnier de ces poissons sera déterminé afin d'identifier les vecteurs potentiels des MCs et enfin le dernier point de ce travail de terrain sur l'observation des effets histologiques lors du maximum d'abondance du bloom. Afin d'apporter des éléments essentiels à l'interprétation des données de terrain, une approche expérimentale a été menée en parallèle. Au cours de ces expérimentations, les processus de contamination et de détoxification, les effets génotoxiques et histologiques ont été évalués lors d'une exposition par gavage des juvéniles de perche à des concentrations pertinentes en MCs (proches de celles potentiellement ingérées par les juvéniles de perche en une journée *via* la consommation de zooplancton) (**Article 3**).

La troisième et dernière partie de ce manuscrit (**chapitre V**) portera sur l'étude, au cours d'un cycle nycthéral, de l'accumulation des MCs par différents taxa zooplanctoniques brouteurs et prédateurs dans l'épilimnion, le métalimnion et l'hypolimnion afin d'évaluer l'impact du bloom de *P. rubescens* sur les déplacements du zooplancton et ainsi les variations de stocks en MCs, transportées par le zooplancton, au cours du temps dans les différentes couches d'eau. De plus,



conjointement à l'identification du régime alimentaire des juvéniles de perche et des corégones, les vecteurs principaux de MCs seront identifiés et les dynamiques de contamination des deux espèces, susceptibles de varier au cours du temps avec les mouvements du zooplancton, seront analysées (**Article 4**).

Ce travail de thèse vise donc *in fine* à apporter un éclairage sur les processus écologiques qui affectent la dynamique des perches et des corégones dans un lac soumis à des efflorescences de cyanobactéries toxiques et améliorer nos connaissances concernant les voies de transferts des toxines en milieu naturel ainsi que leurs potentiels effets physiologiques sur les perches et les corégones. Les études menées ici s'appuient sur une démarche multidisciplinaire qui associe des approches écosystémiques utilisant l'hydroacoustique, la quantification de toxines, et différents traceurs trophiques, et également, des approches expérimentales visant à analyser de manière contrôlée, les voies de transferts trophiques des toxines cyanobactériennes aux poissons et par la suite les effets à court-terme de ces toxines sur les poissons.

En clair, dans la complexité des interactions qui relient les cyanobactéries aux poissons, ce travail de thèse se propose de répondre à différentes questions encore peu étudiées dans la littérature. Ainsi, nous analyserons si (1) la présence d'un bloom de cyanobactérie peut influencer la répartition spatiale des espèces de poisson présentes et entraîner des phénomènes d'évitements ou d'agréations des poissons comme soupçonné dans la littérature. Puis, (2) nous évaluerons les différentes voies de transferts des MCs jusqu'aux poissons et notamment l'importance des différentes espèces zooplanctoniques dans la dynamique de transfert de ces toxines au sein des réseaux trophiques. Enfin, (3) nous étudierons les processus d'accumulation et de détoxification des MCs par les poissons ainsi que les effets potentiels de celles-ci notamment sur l'intégrité des organes et l'induction de dommages à l'ADN.

### 3 Effets de *P. rubescens* et des microcystines sur les populations de corégones (*Coregonus lavaretus*)

#### 3.1 Répartition spatiale saisonnière de *P. rubescens* et du corégone (*C. lavaretus*) dans le lac du Bourget : Implication dans l'accumulation des MCs.

##### 3.1.1 Contexte d'étude

Le lac du Bourget connaît depuis les années 1990 des blooms estivaux récurrents de *Planktothrix rubescens*, une cyanobactérie toxique capable de produire les microcystines, des hépatotoxines nuisibles pour la majorité des organismes aquatiques. Les corégones (*C. lavaretus*), particulièrement appréciés pour leur chair dans les régions péri-alpines, sont des salmonidés dont le preferendum thermique correspond à des eaux froides, généralement situées en dessous de la thermocline. C'est également à ces profondeurs que les blooms de *P. rubescens* sont observés. Cependant, la répartition du corégone en condition de blooms n'a encore jamais été étudiée. Les phénomènes d'évitement des zones à cyanobactéries par des poissons ont déjà été observés expérimentalement (Mastin et al., 2002). Cependant, compte-tenu de la variabilité des observations en fonction des concentrations en cyanobactéries présentes, l'interprétation et l'extrapolation au milieu naturel semblent difficiles (Mastin et al., 2002). *In-situ*, des résultats provenant de 3 échantillonnages acoustiques ponctuels réalisés sur le lac Ammersee (Allemagne) semblaient mettre en évidence une ségrégation spatiale entre le bloom de *P. rubescens* et les corégones (*C. lavaretus*) présents dans ce lac (Ernst, 2008). Afin d'expliquer ce phénomène, la présence de comportements d'évitement fût proposée par l'auteur. Cependant, l'échantillonnage acoustique réalisé avec seulement trois observations ponctuelles pour 3 mois, semble insuffisant pour affirmer que le corégone évite volontairement les blooms de *P. rubescens*. De plus les résultats obtenus par Ernst (2008) semblent montrer que les corégones sont présents dans la couche d'eau en dessous de celle où *P. rubescens* se développe, là où les températures optimales pour le corégone sont atteintes. Ainsi les phénomènes d'évitement observés par cet auteur sont probablement plus liés à la différence d'optimum thermique entre le corégone et *P. rubescens* qu'à un évitement volontaire du corégone pour échapper aux effets indésirables de la cyanobactérie. Par ailleurs, l'utilisation des zones de blooms comme zone refuge a également été mise en évidence

expérimentalement avec des épinoches à trois épines (*Gasterosteus aculeatus*) de petite taille. Le regroupement de ces poissons dans les zones à forte densité de cyanobactéries serait une stratégie pour limiter au mieux la pression de prédation exercée par les espèces prédatrices (Engström-Öst et al., 2006). Les corégones pourraient donc soit éviter les blooms de *P. rubescens* afin d'éviter les effets toxiques engendrés par l'absorption de filaments ou de zooplancton contaminé, soit se regrouper dans la zone à cyanobactérie afin d'éviter les prédateurs potentiels. Le but de cette étude est donc d'étudier le comportement du corégone lors d'un bloom et d'estimer l'exposition réelle de cette espèce à la cyanobactérie. Pour ce faire, l'étude a consisté à évaluer la dynamique saisonnière des corégones et de *P. rubescens* et de comparer les répartitions horizontales et verticales de ces deux organismes afin de savoir si la présence de cette cyanobactérie influence la répartition spatiale du corégone.

### 3.1.2 Résumé de l'étude :

De Juin à Novembre 2009, les distributions spatiales journalières de *P. rubescens* et du corégone (*Coregonus lavaretus*) ont été suivies par sondage fluorimétrique BBE (Moldaenke, Germany) et hydroacoustique (Simrad EK60, 70 kHz, split-beam). Les concentrations en microcystines intracellulaires présentes dans les échantillons de *P. rubescens* ont été quantifiées par chromatographie liquide haute performance couplée à un détecteur UV à barrette de diodes (HPLC/PDA). Par ailleurs, lorsque les plus fortes concentrations en *P. rubescens* étaient présentes dans le lac du Bourget, des corégones ont été capturés et analysés pour examiner à la fois la présence de filaments cyanobactériens dans leur tractus gastro-intestinal par microscopie optique mais également grâce à la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS), l'accumulation possible des microcystines dans leurs tissus.

Les résultats montrent que les abondances de *P. rubescens* sont maximales entre la fin du mois de Juillet et le début du mois de Septembre. Au cours de cette période, *P. rubescens* se stratifie verticalement avec un maxima d'abondance observé entre 14 et 22 mètres en fonction de la station d'échantillonnage. La distribution horizontale de *P. rubescens* est quant à elle variable à l'échelle du lac. Les résultats indiquent que la présence de *P. rubescens*, aux concentrations observées, n'exerce pas une pression significative sur le schéma de distribution spatiale du corégone et ceci quelque soit la taille des individus. En effet, les corégones sont présents dans la même couche d'eau que le maximum de *P. rubescens*. Par conséquent, les corégones ne semblent ni éviter, ni

### Effets de *P.rubescens* et des microcystines sur les populations de corégone (*C. lavaretus*)

rechercher les zones de fortes abondances en *P. rubescens*. Des filaments de la cyanobactérie ont été observés dans les intestins de Corégone et la présence de MC-LR a été détectée dans leur intestin et leur foie. Ainsi, en raison du contact direct entre la cyanobactérie et le corégone, les cyanotoxines peuvent être accumulées dans le corégone par l'ingestion de filaments de *P. rubescens* mais également de nourriture probablement contaminée, entraînant potentiellement des effets adverses sur les organismes et par conséquent sur leur population.

### 3.1.3 Article 1

Harmful Algae 10 (2011) 749–758



Contents lists available at ScienceDirect

## Harmful Algae

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/hal](http://www.elsevier.com/locate/hal)



# Spatial match between *Planktothrix rubescens* and whitefish in a mesotrophic peri-alpine lake: Evidence of toxins accumulation

Benoît Sotton<sup>a,1</sup>, Orlane Anneville<sup>a,1,\*</sup>, Sabrina Cadel-Six<sup>b</sup>, Isabelle Domaizon<sup>a</sup>,  
Sophie Kryś<sup>b</sup>, Jean Guillard<sup>a</sup>

<sup>a</sup> INRA, UMR CARRTEL, F-74203 Thonon Les Bains, France

<sup>b</sup> ANSES – Laboratoire de sécurité des aliments de Maisons-Alfort, F-94701 Maisons Alfort Cedex, France

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 14 October 2010

Received in revised form 23 May 2011

Accepted 21 June 2011

Available online 28 June 2011

### Keywords:

Cyanobacteria

Toxins

*Coregonus lavaretus*

Spatial distribution

Bioaccumulation

Hydroacoustic

## ABSTRACT

Lake Bourget (France) provides drinking water and is a place for professional and recreational fishing. Since the mid 1990s, the lake has been exhibiting blooms of the filamentous cyanobacterium *Planktothrix rubescens*. This species is able to produce microcystin-LR and RR, toxins that contaminate different fish tissues and, if concentrated in the liver, can induce fish mortality. However, data on fish exposure to these toxins in a natural environment are scarce and comparisons of spatial distribution between *P. rubescens* and exploited fish are needed to determine whether these fish avoid or converge in zones affected by the cyanobacteria. From June to November 2009, diurnal data on *P. rubescens* and whitefish (*Coregonus lavaretus*) spatial distributions have been monitored by hydroacoustic and BBE probe sampling. For all water samples, intracellular microcystin concentration of *P. rubescens* was quantified by HPLC/PDA. Furthermore, an arbitrary sample of eight whitefish captured at the moment of highest *P. rubescens* concentration in the lake were analyzed to investigate both the presence of this cyanobacterium in the gastrointestinal tract by optical microscopy and the possible bioaccumulation of the microcystin in their tissues by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Results show that *P. rubescens* abundance was at a maximum between the end of July and the beginning of September. During this period, *P. rubescens* abundance was vertically stratified with a maximum around 14–22 m, depending on the sampling station. The horizontal distributions of *P. rubescens* were heterogeneous at the scale of the lake. Results indicate that the presence of *P. rubescens*, for the observed cyanobacterial abundance, does not exert a significant pressure on the distribution pattern of the whitefish. Whitefish were present in the same areas as *P. rubescens* maxima during daytime, and they do not avoid or seek out the zone of high *P. rubescens* abundance. Filaments of *P. rubescens* have been observed in intestinal tracts of whitefish and the presence of microcystin-LR has been detected in their intestine and liver. Consequently, because of a direct contact between these organisms, toxins can be incorporated into whitefish by ingestion of *P. rubescens* filaments, leading to potential adverse effects on the health of this species.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Cyanobacterial blooms in lakes have been observed throughout history (Anderson et al., 2002; Briand et al., 2003) but since the end of the last century, their incidence has been increasing in response to changes in nutrient loading (Anderson et al., 2002). In addition, the expected warming of the climate should favour their occurrence (Paerl and Huisman, 2008; Jöhnk et al., 2008; Wagner and Adrian, 2009), posing potential risks to human health, fish ecology and ecosystem sustainability. Cyanobacteria belonging to

genera such as *Microcystis*, *Aphanizomenon*, *Anabaena*, and *Planktothrix*, commonly found in bloom-form in aquatic ecosystems during the summer, are able to produce toxins (Sivonen and Jones, 1999). Throughout the world, the microcystins (MC), a family of hepatotoxins consisting of more than 90 variants (Anjos et al., 2006; Welker and Von Döhren, 2006) is the most studied. The presence of these toxic blooms in freshwater ecosystems is often linked with ecological disturbances which affect all trophic food web compartments (Anderson et al., 2002; Codd et al., 2005). Generally, an overall decrease in diversity of phytoplanktonic population (Granéli et al., 2008) and a decrease in the abundance and diversity of the zooplanktonic compartment are observed during toxic cyanobacterial blooms (Ghadouani et al., 2003; Wiegand and Pflugmacher, 2005; Wilson et al., 2006). In addition,

\* Corresponding author. Tel.: +33 4 50 26 78 04; fax: +33 4 50 26 07 60.

E-mail address: [orlane.anneville@thonon.inra.fr](mailto:orlane.anneville@thonon.inra.fr) (O. Anneville).

<sup>1</sup> These <fn0005>authors contributed equally to this work.

# Effets de *P. rubescens* et des microcystines sur les populations de corégone (*C. lavaretus*)

750

B. Sotton et al. / Harmful Algae 10 (2011) 749–758

the fish compartment is also impacted: indeed, massive mortalities can result from poisoning through ingestion of toxic cyanobacterial filaments during the bloom (Wiegand and Flugmacher, 2005) and are also commonly observed during the bloom collapse when significant concentrations of intracellular microcystins are released into the water (Jewel et al., 2003; Malbrouck and Kestemont, 2006). The fish compartment can be indirectly affected by a dramatic decrease in oxygen concentration and an increase in the pH of the water during the bloom because of cyanobacterial respiration, or bacterial degradation of cyanobacterial organic matter (Rashidan and Bird, 2001). In the longer term, the alteration of fish population dynamics could have negative ecological and economical impacts (Ernst et al., 2001). Finally, some studies have shown the possible accumulation of microcystins in several freshwater fish tissues, particularly the liver but also to some extent in muscles (Cazenave et al., 2005; Deblois et al., 2008; Chen et al., 2009). This phenomenon may have a possible human health impact due to the consumption of contaminated fish (Cazenave et al., 2005; Deblois et al., 2008; Chen et al., 2009).

In the peri-alpine area, whitefish (*Coregonus lavaretus*) is a highly commercialized zooplanktivorous fish, and several peri-alpine lakes present high development of the cyanobacterium *Planktothrix rubescens* which is known to produce principally two variants of microcystins: microcystin-LR (MC-LR) and microcystin-RR (MC-RR) (Jann-Para et al., 2004; Briand et al., 2005; Paulino et al., 2009). Physiological and, histopathological disturbances and behavioral changes have been confirmed through experiments on whitefish exposed to *P. rubescens* (Ernst et al., 2006, 2007). However, few studies exist on whitefish distribution in lakes during bloom events. In this study we analyzed the daily spatio-temporal distribution of the whitefish population in the peri-alpine Lake Bourget during the summer cyanobacterial bloom to understand if whitefish avoid, seek out or are indifferent to the presence of the toxic cyanobacteria, estimating in this way the real exposure of this species to toxic *P. rubescens*. At the moment of higher concentration of *P. rubescens* in the lake, we investigated the presence of this cyanobacterium in the gut content of whitefish to determine the possible ingestion of *P. rubescens* filaments and we quantified the amount of microcystin-LR in their tissues (liver, intestine, gills and muscles) to reveal the potential accumulation of this toxin in these tissues. Such information on relationships between the distribution of edible fish, toxic cyanobacterial bloom and microcystin bioaccumulation, would provide essential clues to understand the pathway of toxin transfer to fish, to estimate the potential risk to human health and to identify the impact of cyanobacterial blooms on the daytime vertical and horizontal distribution of whitefish in a lake (Lake Bourget) subject to recurrent blooms of *P. rubescens* during summer.

## 2. Material and methods

### 2.1. Study site

Lake Bourget (45°44'N, 231 m altitude) is a mesotrophic and warm monomictic lake, situated in the eastern part of France. It is the largest natural French lake with an area of  $42 \times 10^6 \text{ m}^2$ , a total volume of  $3.5 \times 10^9 \text{ m}^3$  and maximum and average depths of 145 and 80 m, respectively (Jacquet et al., 2005). In addition, the lake stretches 18 km along the North–South axis with a width of between 1.6 and 3.5 km. The lake is subject to strong human pressures and its water is used as a supply of drinking water, and for recreational activities and fisheries. The development of the freshwater cyanobacterium, *P. rubescens*, was reported in the 1950s (David, 1967) but, the intensity and occurrence of blooms has been more precisely described since the 1990s (Jacquet et al., 2005). This cyanobacterium develops, during summer, in the

metalimnic layer at varying depths depending on the year (Briand et al., 2005; Jacquet et al., 2005).

### 2.2. Field sampling strategy for *P. rubescens*

Based on the knowledge of homogeneous distribution of cyanobacteria, bacterioplankton and whitefish in the two basins of the lake (Humbert et al., 2001; Dorigo et al., 2006; Degiorgi et al., 2006), we chose to obtain a fine resolution of both vertical and horizontal distribution of *P. rubescens* and whitefish in only the northern basin (Fig. 1).

Six East–West transects were realized twice a month. Three points per transect were sampled during field surveys, one in the middle and one at either end of each transect (Fig. 1). At each sampling point, a calibrated (*ex situ*) BBE Fluoroprobe (Moldaenke, Germany) was used to estimate the vertical distribution of *P. rubescens* biomass (Leboulanger et al., 2002), simultaneously, a multiparameters probe (Seabird 19plus, Sea-Bird Electronics, Inc., USA) was employed to determine the thermocline depths. In addition, 2-L water samples were taken at these sampling points at

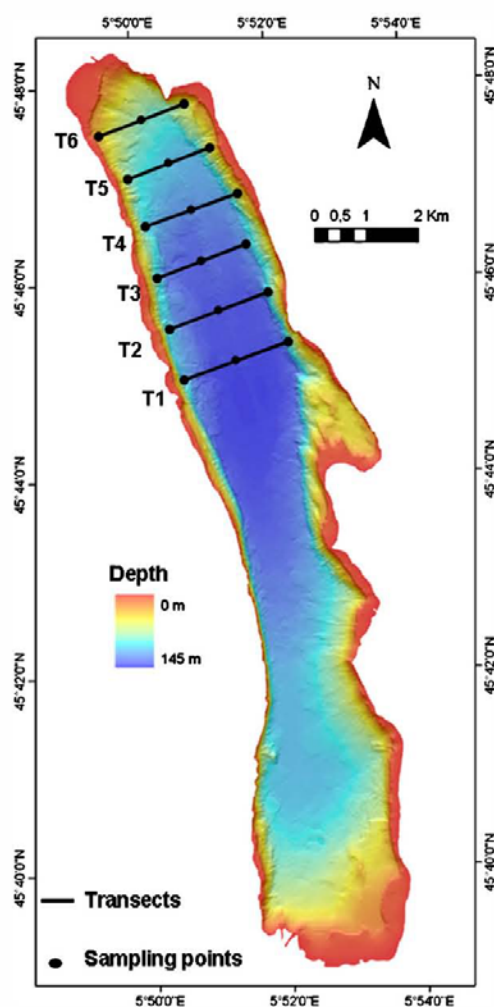


Fig. 1. Map of Lake Bourget based on Ledoux et al. (2010) showing the transects and the sampling stations.



three depths (6, 12 m and at the depth of *P. rubescens* peak) for microcystin analysis. The water samples were filtered through a 1- $\mu$ m filter (Nucleopore, Whatman) and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until microcystin analysis.

### 2.3. Sampling strategy for whitefish distribution

At the same time, whitefish (*C. lavaretus*) spatial distribution was studied by using hydroacoustics. Data were recorded between each of the sampling points and only data between 15 m and 30 m (below the thermocline) were analyzed to target whitefish distribution more specifically. Indeed, in deep temperate lakes, the temperature fence structures the fish population: the cyprinids and percids are above, and the salmonids, mainly whitefish in the Lake Bourget (S. Cachera, personal communication) are below the thermocline (Masson et al., 2001; Guillard et al., 2006; Mehner et al., 2010). Below 30 m depth, the fish density was very low and non-significant. The echosounder used was a Simrad EK60, 70 kHz, split-beam, with a total beam angle of  $11^{\circ}$  at  $-3$  dB, the transducer being pole fixed along the boat at a depth of 0.5 m. The parameters used were as follows: pulse-length 0.256 ms, 5 emissions/s. The sounder's calibrations were carried out once per year in a large basin (100 m length, 25 m depth, IFREMER, Brest) according to the standard protocol of Foote et al. (1987) then repeated under field conditions to check for consistency. The water temperature was measured before the survey in order to adjust the sound speed parameter and the attenuation coefficient  $\alpha$ . Thresholds were fixed at  $-60$  dB for individual targets ( $40 \log R$ ) and  $-55$  dB for echointegration ( $20 \log R$ ) (Simmonds and MacLennan, 2005; Guillard et al., 2006). The criteria used for individual target discrimination were the default criteria recommended by the manufacturer. The acoustic data were analyzed with the Sonar5-Pro software (Balk and Lindem, 2006) in order to calculate total acoustic fish biomass in  $\text{Sa}$  ( $\text{m}^2 \text{ha}^{-1}$ ), the acoustic energy reflected per unit of area, and to estimate size classes in dB (Target Strength, TS), the quantity of energy reflected by an individual target (MacLennan et al., 2002) by Elementary Sampling Distance Unit (ESDU). The ESDU was fixed at 250 m, using a mean speed of  $8 \text{ km h}^{-1}$ , a GPS was connected to the sounder to acquire the boat's position.

### 2.4. Whitefish sampling catches

*C. lavaretus* were captured using gillnets by a professional fisherman during the night of the 7th/8th of September 2009, killed and ice-cooled. Thus, fish were bought and analyzed to assess toxin contents of various organs. Then, fish were dissected, liver, gills, intestine and muscles were isolated and lyophilized prior to microcystin extraction. A fraction of each gastrointestinal content was kept for microscopic observations to determine the presence of cyanobacterial cells. Similarly to other studies that analyzed the tissue of few individuals for one or multiple species (Chen et al., 2006; Xie et al., 2005; Magalhães et al., 2001), a restricted number ( $n = 8$ ) of fish has been analyzed. If microcystin can be detected in at least one fish, eight fish would be enough to answer positively the question whether microcystin can transfer till the fish.

### 2.5. Microcystin analysis of *P. rubescens*

For intracellular microcystin extraction, each filter was placed in a haemolysis tube, extracted with 2 mL of 75% methanol and sonicated for 20 min in an ultrasonic bath (Elma Sonic). This step was performed twice. The crude extract was centrifuged (Beckman AVANTI J30 I) at 20,000 rpm for 90 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . The supernatant was collected with a 5 mL syringe, filtered through a 0.2- $\mu$ m

syringe filter (PTFE, Whatman) and finally evaporated with a Speedvac device (Speed-vac Plus SC110A, Savant). The filtered extracts were dissolved in 10% methanol and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  (Briand et al., 2005).

Intracellular microcystins were quantified by high performance liquid chromatography with photodiode array (PDA) detection (HPLC/PDA). The chromatographic resolution of microcystins was achieved using the following mixtures of MilliQ-water – 0.3% (v/v) trifluoroacetic acid (A) and acetonitrile (B) as the mobile phase, in an elution gradient run on a chromatographic system (Waters) equipped with Waters 600 pump controller, a PDA 996 photodiode-array detector, a C18 PHENOMENEX Luna 5  $\mu$ m (4.6 mm  $\times$  250 mm) column and Waters<sup>3.2</sup> millennium chromatography manager software. The flow rate was 1 mL/min and MCs peaks were identified on the basis of their characteristic absorption spectra (maximum absorption at 238 nm) and by their retention times in comparison to those of the microcystin-LR and microcystin-RR (SIGMA, France) standards (Briand et al., 2005).

### 2.6. Extraction of free microcystins from different tissues of *C. lavaretus*

200 mg of freeze-dried liver, gills, intestine and 2 g of freeze-dried muscle were homogenized with 20 mL and 200 mL of the extraction solution water:methanol:butanol (75:20:5), respectively, using a Polytron PT3100 homogenizer (Switzerland). Homogenates were sonicated for 1 min with a Bandelin Sonoplus HD2070 sonicator (Germany) set at 37% power and left at room temperature for 16 h. Afterwards the samples were sonicated for 15 min with a Branson 3510 ultrasonic bath (USA) and centrifuged at  $12,000 \times g$  for 10 min. Supernatants were collected and 1 volume of water was added to reduce solvent strength (v/v). The solid phase extraction was performed as described by Neffling et al. (2010) except for the column: Strata X column (60 mg) (Phenomenex, France) instead of OASIS (30 mg) (Waters, France). The columns were previously conditioned with 4 mL methanol (MeOH) and 6 mL  $\text{H}_2\text{O}$ . The samples were loaded by gravity, and the columns were washed successively with 4 mL of MeOH 20%. Fractions containing the toxin were eluted twice with 1.2 mL MeOH 90%–TFA 0.01%. After solvent evaporation, the residues were dissolved in 200  $\mu$ L of MeOH 35%–AcOH 0.05%, sonicated for 15 min with a Branson 3510 ultrasonic bath (USA), vortexed for 1 min and centrifuged at  $12,000 \times g$  for 10 min. The supernatants were then collected for injection.

### 2.7. LC–MS/MS analysis of microcystin-LR in whitefish

The LC–MS/MS analysis was performed with an Agilent 1100 binary HPLC system (Waldbronn, Germany) coupled to an API3000 (Applied Biosystem, USA) triple quadrupole mass spectrometer with electrospray ionization (ESI) source. The column was a HYPERSIL BDS C8 3  $\mu$ M, 50 mm  $\times$  2.1 mm (Thermo – Fisher Scientific, France) kept at  $40^{\circ}\text{C}$ . The mobile phase consisted of solvent A: 0.1% formic acid and B: acetonitrile, and the gradient program for MC detection was from 25% to 90% B over 8 min, held at 90% B for 1 min, followed by equilibration at 25% for 4 min, with a flow rate of 250  $\mu$ L/min. The injection volume was 5  $\mu$ L. Multiple Reaction Monitoring (MRM) transitions and compound-dependant parameters were optimized by direct infusion into the source of a standard solution (1  $\mu$ g/mL). Two characteristic productions, in positive mode,  $m/z$  135.3 (characteristic ADDA fragment) and  $m/z$  213.3 (Glu-Mhda) were measured. The nitrogen gas temperature (TEM) to dry the eluent was set at  $550^{\circ}\text{C}$ . The declustering potential (DP) was set at 120 eV and the ion spray voltage at 5500 eV. The collision energies were set at 100 eV and 84 eV respectively for the transition 995.8/135.3 and 995.8/213.3.

Calibration curves were established for the standard MC-LR (Enzo Life Sciences, Switzerland) (0.5, 1, 5, 10, 30 and 50 ng/ml). Five replicates were run for each concentration. The linear curve has an  $R^2$  value of 0.9998. The limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) were estimated as the concentration responding to a signal-to-noise (S/N) ratio of 3 and 10, respectively. The LOD was determined to be 0.5 ng/ml and the LOQ 1.6 ng/ml.

### 2.8. Statistical analysis

The link between *P. rubescens* concentrations and the MC (LR + RR) concentrations obtained between June and November 2009 was calculated using a Pearson's correlation coefficient. The link between the vertical structures of the whitefish and *P. rubescens*, recorded simultaneously, was analyzed using the abundance data obtained with the BBE and the hydroacoustic survey data. For each sampling point, fish and *P. rubescens* abundances were averaged for every 2 m water layer, then ranked and Pearson's correlation coefficients calculated. Pearson correlations on ranked data were used rather than Spearman correlation, because of redundant ranks in the data. Significant correlation between the vertical distribution of fish and cyanobacteria were assumed for a  $p$ -value < 0.05.

The horizontal distributions of *P. rubescens* and whitefish were described by density maps, measured over the 15–30 m depth. Whitefish and *P. rubescens* abundances were normalized, using a transformation for both data, into a relative scale from 1 to 100,  $(x - x_{\min}) / (x_{\max} - x_{\min}) \times 100$  and calculated using a Pearson's correlation coefficient to describe the link between their horizontal structures. A positive correlation indicates that whitefish give preference to areas with cyanobacteria whereas a negative correlation indicates avoidance of cyanobacteria.

## 3. Results

### 3.1. Relationship between the abundance of *P. rubescens* and intracellular MC (LR + RR) concentrations

High abundance of *P. rubescens* was generally associated with high concentrations of microcystins (Fig. 2). Although some variability could be detected, a significant correlation between *P. rubescens* abundance and intracellular microcystin concentration was observed ( $r = 0.82$ ,  $p$ -value < 0.001).

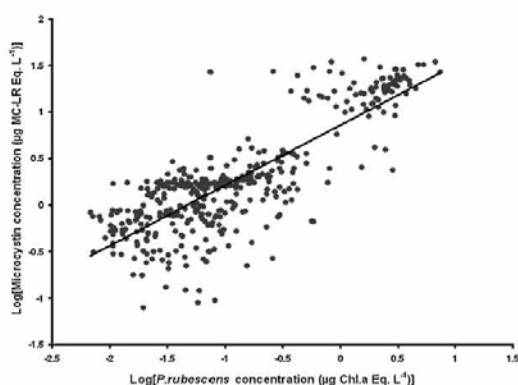


Fig. 2. Relationship between the intracellular MC (LR and RR) concentration measured by HPLC/PDA and *P. rubescens* concentration (Eq. Chl.  $a$   $L^{-1}$ ) measured using a Fluoroprobe from all the vertical profiles obtained between June and November 2009 ( $y = 0.1116x$ ,  $r^2 = 0.67$ ,  $n = 540$ ).

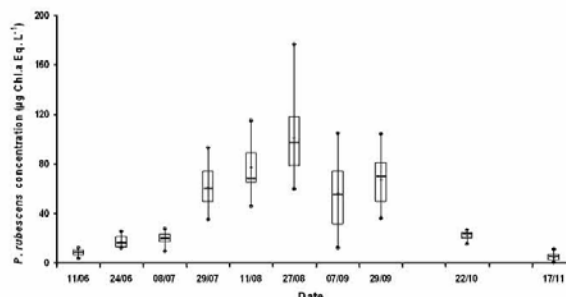


Fig. 3. Temporal changes in cumulative concentrations of *P. rubescens* between 15 and 30 m. Box-plots illustrate the spatial variability of the cumulative concentration of *P. rubescens* measured at each date (mean and median are indicated within the box).

### 3.2. Temporal and spatial variability in the abundance of *P. rubescens*

Between June and November, the temporal dynamic of *P. rubescens* abundance was similar whatever the sampling point of the lake. Despite horizontal heterogeneity of the cumulative abundance measured over the 15–30 m (Fig. 3), globally, a bloom of *P. rubescens* was present from late July to late September in Lake Bourget (Fig. 3). The maximum concentration of *P. rubescens* measured within the peak, 30  $\mu g$  Chl.  $a$   $L^{-1}$ , was observed on the 27th August and the 7th of September 2009.

For every sampling point, *P. rubescens* showed a vertical pattern characterized by a localized maxima and very low concentrations above and below this peak. The depth of the peaks was variable according to the area sampled (Fig. 4). During the bloom period (from July to September), it varied between 14 m and 22 m. During the whole sampling period, peaks of *P. rubescens* were situated below the thermocline, except for the 29th of September (Fig. 4).

### 3.3. Relationship between the whitefish and *P. rubescens* distribution

Fish density varied greatly according to the date of sampling and localization (Fig. 5), with a mean amount by survey from 9 to more than 35  $kg$   $ha^{-1}$ . However, the distribution of *C. lavaretus* showed neither preference nor avoidance of the cyanobacterial area. Comparison of whitefish abundance and *P. rubescens* horizontal distributions (Fig. 5) did not show any relationship between these two compartments ( $r = 0.047$ ;  $p = 0.5302$ ;  $\alpha = 0.05$ ;  $n = 178$ ). The percentage of non-significant relationships ( $p$ -value > 0.05) between the vertical distributions of *P. rubescens* and whitefish reached almost 92% on the 27th of August and almost 88% on the 7th of September. On the other dates, the percentage of non-significant relationships was found consistently to be above 83% of cases, except on the 8th of July when this value reached 65% of cases (Table 1). Whitefish were situated between 15 and 30 m in the same water layer as *P. rubescens* and no vertical distribution according to the size of the whitefish was shown (Fig. 6). This type of distribution was observed throughout the whole sampling season. Thus, *P. rubescens* distribution did not seem to affect the vertical or horizontal distribution of the different size of whitefish.

### 3.4. Microscopic observation of gastrointestinal content of whitefish and MC-LR analysis in whitefish tissue

Zooplankton and a few filamentous cyanobacteria were observed in the gastrointestinal content of the eight whitefish



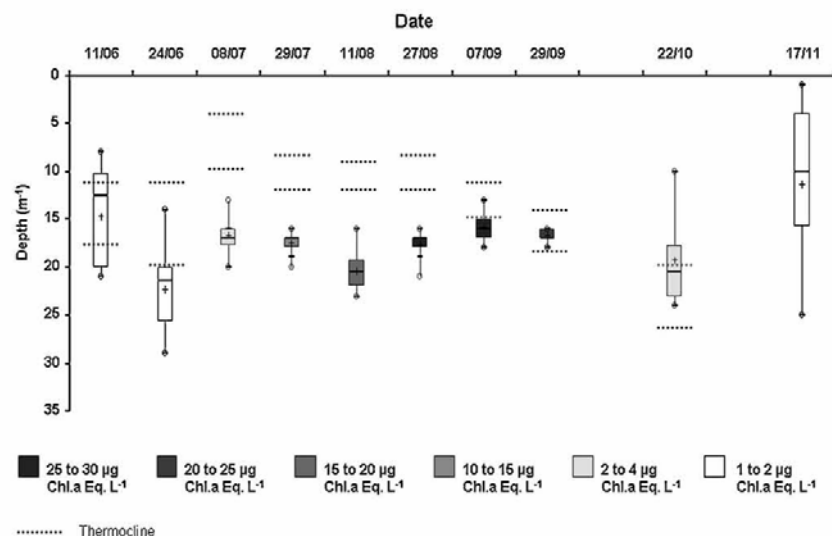


Fig. 4. Concentrations (levels of grey) and depth (box-plot) of *P. rubescens* peaks for the different sampling points between June and November 2009. The dotted line indicates the maximum and minimum depths of the thermocline recorded at each date.

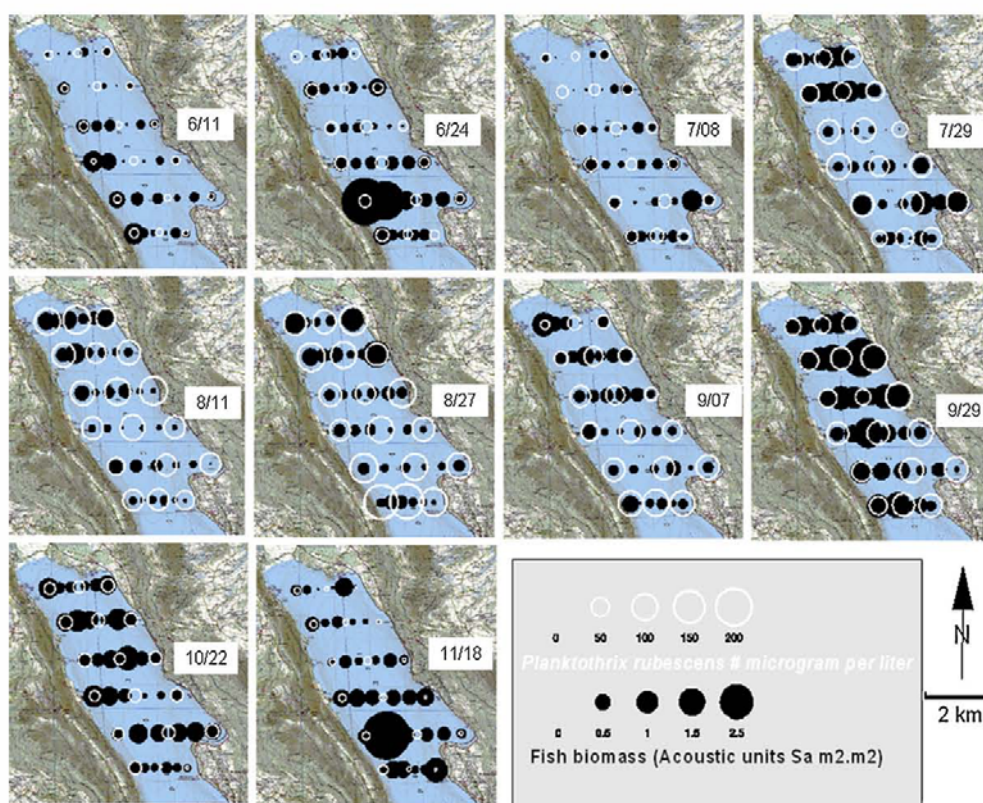


Fig. 5. Spatial distribution of fish and *P. rubescens* abundances observed for each sampling date in the North part of Lake Bourget.

analyzed. On the basis of morphological criteria (dimension and color), the filamentous cyanobacteria were identified as *P. rubescens* of the order Oscillatoriales (Botanical code sensu Komárek and Anagnostidis, 2005) (Fig. 7).

Five of the eight whitefish analyzed presented MC-LR in their intestine and/or liver demonstrating their bioaccumulation

in these tissues. The highest concentrations of the toxin were observed in the liver of two specimens, 15.40 and 6.05 ng/g dw, respectively. Moreover, in two of the five fish contaminated, only the intestine presented MC-LR, at concentrations of 1.61 and 5.18 ng/g dw. These results could be indicative of recent ingestion of toxic *P. rubescens* filaments. On the contrary, in all

# Effets de *P. rubescens* et des microcystines sur les populations de corégone (*C. lavaretus*)

754

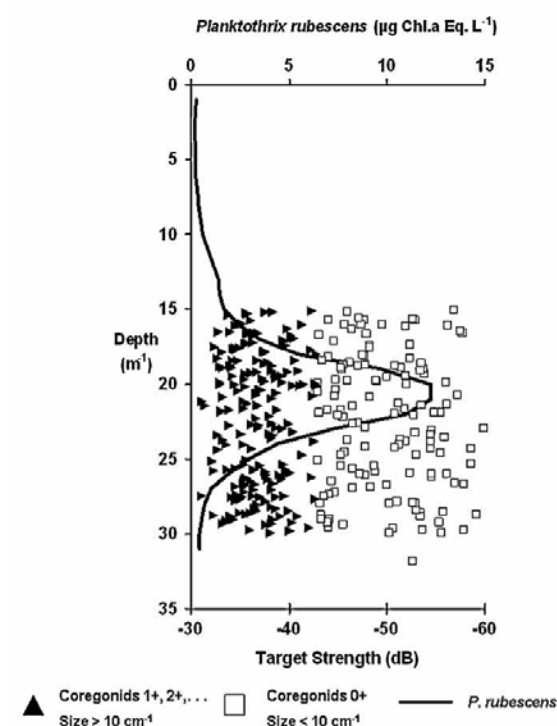
B. Sotton et al. / Harmful Algae 10 (2011) 749–758

**Table 1**

Percentages of significant (positive and negative) and non-significant correlations ( $p$ -values  $>0.05$ ) between the vertical distribution of *P. rubescens* and whitefish abundance measured between 15 and 30 m depth during summer and early autumn 2009.

Date (n = number of measurement)	Positive correlation (%)	Negative correlation (%)	No correlation (%)
8th of July (n = 21)	33	0	67
29th of July (n = 24)	17	0	83
11th of August (n = 24)	8	4	88
27th of August (n = 24)	4	4	92
7th of September (n = 24)	13	0	88
29th of September (n = 24)	17	0	83
22nd of October (n = 21)	10	0	90

samples, MC-LR was not detected in the gills nor muscles. The results of the analyses of the tissues of *C. lavaretus* are summarized in Table 2. The concentration of the samples was calculated from the calibration curves (Fig. 8). However, for all tissue samples a matrix effect generated a shift in retention time of around a minute compared to the standard solution and swamping of the ion current. Nevertheless, the results were calculated unambiguously thanks to the presence on the chromatogram of both of the peaks corresponding to the MRM transitions 995.8/135.3 and 995.8/213.3 specific for the MC-LR as shown in Fig. 9.



**Fig. 6.** Vertical distribution of the young-of-the-year whitefish (white square) and whitefish older than the young-of-the-year (black triangle) during summer bloom of *P. rubescens*, example of the 7th of September 2009 survey.



**Fig. 7.** Microscopic observation of cyanobacterial filaments (*P. rubescens*) in the gastrointestinal contents of whitefish. Photography was performed using a Plan-Neofluar objective (40×/0.75 Oil Ph) using an Axioskop 2 microscope (Carl Zeiss Jena). (A) On light and (B) on phase contrast.

## 4. Discussion

Recurrent *P. rubescens* blooms in Lake Bourget have been observed since the mid 1990s (Jacquet et al., 2005). In parallel, measurements of intracellular microcystins indicate the presence of these toxins at concentrations that can exceed the recommended World Health Organization limit for drinking water (Humbert, 2006). During our study from June to November 2009, *P. rubescens* biomass and the associated microcystin concentrations have followed a classical temporal development pattern characterized by low concentrations of *P. rubescens* and microcystins in June and July, a bloom period with high concentrations of toxins in August and September and the bloom senescence in October and

**Table 2**

Concentration of MC in different tissues of *C. lavaretus* naturally exposed to toxic cyanobacterial blooms of *P. rubescens* in the lake Bourget.

Fish weight (g ww) <sup>a</sup>	MC-LR (ng) <sup>b</sup>	MC-LR (ng/g dw) in:			
		Liver	Gill	Intestine	Muscle
280	4.11	nd	nd	1.61	nd
300	95.11	15.40	nd	5.16	nd
340	nd	nd	nd	nd	nd
350	26.39	6.05	nd	2.78	nd
380	nd	nd	nd	nd	nd
450	15.67	nd	nd	5.18	nd
550	nd	nd	nd	nd	nd
590	31.08	4.25	nd	3.95	nd

<sup>a</sup> Weight without tip.

<sup>b</sup> Concentration in MC-LR equivalent (MC-LR and MC-RR) in organs. nd: not detectable, below detection limit of 0.5 ng/g; quantification limit of 1.6 ng/g.



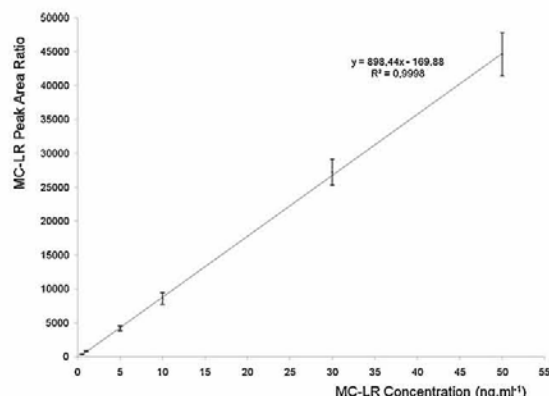


Fig. 8. Calibration curve showing the relationship between the MC-LR concentration and the MC-LR peak area ratio.

November. The presence of *P. rubescens* is always associated with intracellular microcystin concentrations, and our results are in agreement with those of Briand et al. (2005) who have shown a significant correlation between these two variables. In Lake Bourget, abundance of *P. rubescens* thus provides a proxy for microcystin concentration. However, some variability in microcystin content for equivalent *P. rubescens* densities was observed. This variability might be due to measurement bias or spatial differences in somatic growth rates which influence the production of toxins and thus intracellular microcystin content (Deblois and Juneau, 2010; Briand et al., 2005; Long et al., 2001). Moreover, some differences in the proportions of MC-producing and non-MC-producing subpopulations could explain the heterogeneity of microcystin concentration for a given abundance of cells. Data are still scarce about the impact of environmental parameters on the

production of cyanotoxins. The *mcy* gene cluster encodes for genes involved in microcystin biosynthesis, and some authors have clearly shown that deletions and insertions could occur in *Planktothrix* *mcy* operon, explaining the presence of non-producing strains (Christiansen et al., 2008). Some inactive *mcy* genotypes of *P. rubescens* were previously detected in various lakes (Kurmayer et al., 2005). We assume that in Lake Bourget, microcystin producers could co-occur with non-microcystin producers, explaining some variability in the relationship between microcystin concentration and *P. rubescens* abundance.

The *P. rubescens* peak has previously been found to occur between 10 and 15 m depth (Jacquet et al., 2005) and between 12 and 18 m depth (Briand et al., 2005). During our study some variation to the depth at which *P. rubescens* exhibited a peak was observed, the maximal cyanobacterial abundance varied between 14 and 22 m depth. Different hypotheses could explain the inter-annual variations of the peak depth. Indeed, *P. rubescens* is adapted to low light intensities (Walsby, 2005; Oberhaus et al., 2007), low temperatures (Briand et al., 2004; Oberhaus et al., 2007) and possess gas vesicles which allow it to adjust its position in the water column to find the optimal growing conditions. These properties make it well adapted to lakes undergoing reoligotrophication characterized by a nutrient depleted epilimnion and a nutrient rich metalimnion (Anneville et al., 2002, 2005) and may explain their occurrence in such lakes (Dokulil and Teubner, 2000). Continuous decrease in nutrient concentrations (Jacquet et al., 2010), or interannual changes in light intensity or temperature may compel *P. rubescens* to migrate deeper to find the optimal growth conditions.

Our study has also highlighted a spatial heterogeneity within both the vertical and horizontal distribution of *P. rubescens*. On a vertical scale, *P. rubescens* peaks were situated at different depths according to the sampling point. The presence of physical factors like internal waves could explain such differences. In the Lake Bourget, internal waves which are created after wind events

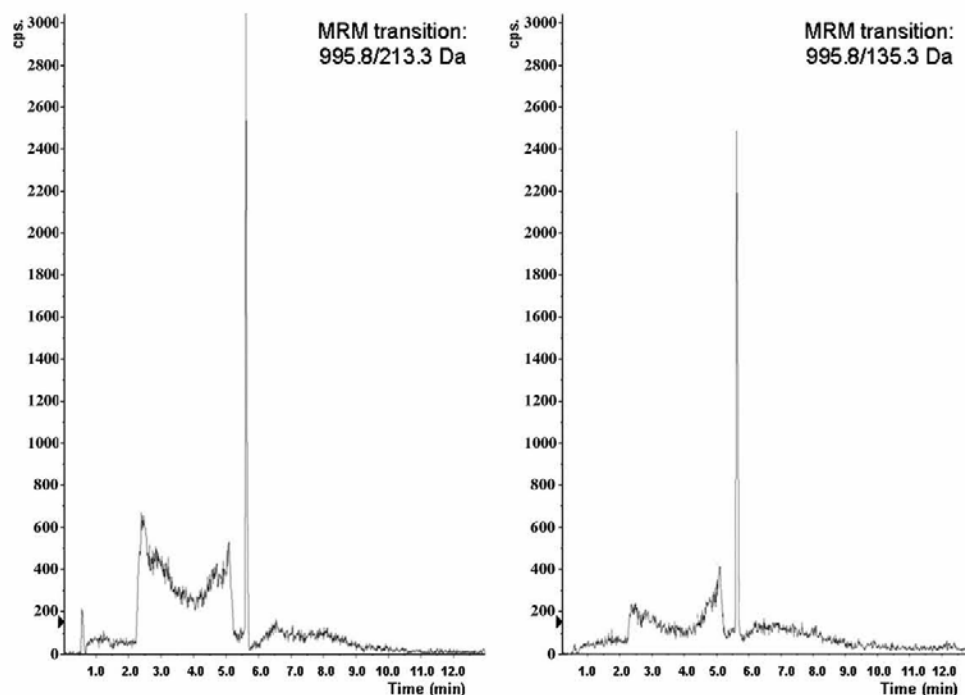


Fig. 9. Chromatogram of MC-LR in an extract of whitefish liver. MRM transitions: 995.8/135.3 and 995.8/213.3, at retention time of 5.62 min.

induce oscillations of the isotherms. Recently, Cuypers et al. (2011) have shown that this physical event could cause a variation in the vertical and horizontal *P. rubescens* distribution between the North and the South of Lake Bourget. However, in spite of the variability in the depth of *P. rubescens* maxima, the peaks are always localized within the water layer corresponding to the thermal preferendum of whitefish.

Few studies deal with the distribution of whitefish during toxic cyanobacterial bloom events in natural ecosystems. There is little information in the literature about physical contact and particularly about the possible match or mismatch in their spatio-temporal distributions. It is essential to get more precise knowledge about the potential interactions which exist between toxic cyanobacteria and these fish in order to investigate efficiently the possible pathway of toxin transfer to fish.

According to our results the spatial distribution of whitefish, during daytime, does not seem to be affected by the abundance of *P. rubescens*. Neither avoidance nor aggregation behaviors have been observed in Lake Bourget for the recorded abundance of cyanobacteria. Also, an experiment on the three-spined stickleback ( $L = 5.85 \pm 0.06$  cm) showed the use of cyanobacteria as a refuge area in the presence of predator chemical cues (Engström-Öst et al., 2006). These experimental conditions were far from the natural conditions found in Lake Bourget. Indeed, Engström-Öst et al. (2006) used *Nodularia spumigena* like toxic cyanobacterium at a concentration of  $800 \mu\text{g DW L}^{-1}$ . On one hand, this concentration is almost 27 times higher than the maximum concentration found during our field study. On the other hand, these authors worked with dried cyanobacterium. The drying step could lead to a release of toxins before the contact with experimental fish. Consequently, a high biomass of cyanobacteria probably with low concentrations of intracellular toxins could represent a better refuge than a low biomass of cyanobacteria with more intracellular toxins as found in our study. Moreover, during the experiment by Engström-Öst et al. (2006), the chemical cues come from perch (*Perca fluviatilis*) conserved in a 30 L tank before experiment. Consequently, the concentration in chemical cues was probably greater than that found in the 15–30 m layer of Lake Bourget. Even when considering that, in Lake Bourget, the adult perch (*P. fluviatilis*) is the most abundant predator, the predation pressure exerted by the perch on the whitefish, mainly juveniles, is very low (Degiorgi et al., 2006) and does not seem to cause the whitefish to seek refuge in the bloom layer. Our study highlights that the behavioral changes of fish in response to the presence of toxic cyanobacteria are probably complex, and could be different according to fish and cyanobacteria species considered but also according to the intensity of predation pressure and bloom. Some contradictory results were obtained about the behavior of avoidance exhibited by whitefish in the presence of *P. rubescens* blooms. In a field study, Ernst (2008) showed that whitefish tend to migrate to deeper water during the summer bloom to avoid the presence of *P. rubescens*. We did not observe such behavior, with whitefish being present below the metalimnic layer in the same water layer as *P. rubescens*, and in our study, we assume that the whitefish distribution was instead influenced by the thermal preference of the whitefish as proposed by Mehner et al. (2010). Probably, the level of cyanobacteria concentration could be a deterministic factor in the explanation of avoidance behavior as highlighted by Mastin et al. (2002) in experimental approaches. These authors have shown that fish species avoided areas with cyanobacteria at  $175 \mu\text{g Chl. } a \text{ Eq. L}^{-1}$ , but not at concentrations lower than  $175 \mu\text{g Chl. } a \text{ Eq. L}^{-1}$ . In Lake Bourget, *P. rubescens* concentrations are lower than this value, this low concentration of cyanobacteria could explain why in our daytime study avoidance behavior of the whitefish during a *P. rubescens* bloom episode has not been observed.

In Lake Bourget, direct contact between whitefish and *P. rubescens* could favour possible intoxication via ingestion of

cyanobacterium filaments which are free in the water column or attached on zooplankton. Indeed, similarly to Ernst (2008) who reported the presence of *P. rubescens* filaments in the gut, the analysis of intestinal tracts of whitefish caught in Lake Bourget indicate that the cyanobacteria has been ingested. There are a variety of possible routes for the uptake of microcystins. Dissolved microcystins might be absorbed from water via the gills, the intestine or the integument, and fish might further be intoxicated due to digestion of ingested toxic cyanobacterial cells or contaminated zooplankton. As deduced from various experimental microcystin exposures of trout, the most likely uptake route is the oral ingestion of either dissolved microcystins and/or microcystin containing cells with a consequent toxin uptake via the digestive system (Bury et al., 1995; Tencalla et al., 1994). Moreover, several experiments carried out on fish and mice showed that fish are more sensitive than mice to orally applied microcystins, which suggests fish to be particularly susceptible to the effects of oral ingestion of microcystins and microcystin containing cyanobacteria (Ernst, 2008).

The consequences of filament ingestion are evident from our results, microcystin-LR accumulation has been observed in the intestine and liver of five of the eight whitefish analyzed. The small number of sampled fishes do not allow to draw conclusions but the presence of microcystin-LR in five fishes indicates that toxin transit to fish. Indeed, several studies underline that having traversed the epithelial barrier of intestine, microcystins accumulate primarily in the liver of exposed fish following the portal venous bloodstream (Cazenave et al., 2005; Fischer and Dietrich, 2000; Soares et al., 2004). Microcystins have been showed to accumulate in the liver of carp and trout orally exposed to the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* as of 1 h post-application (Fischer and Dietrich, 2000; Tencalla et al., 1994). Smaller amounts have also been shown to accumulate in kidney, blood, gills, bile, intestine and brain while only minimal amounts have been detected in muscle tissue (Cazenave et al., 2005; Fischer and Dietrich, 2000; Xie et al., 2005). In our study, no microcystin-LR was detected in the gills, or in the muscles. The whitefish analyzed were caught during high concentration of *P. rubescens* at the beginning of September. These fish have probably been exposed over a period of several months to the presence of toxic *P. rubescens* in the water. The accumulation of microcystin-LR in the intestine of analyzed whitefish is in agreement with the optical observation of the intestinal tracts. The filaments of *P. rubescens* ingested had to be toxic and the microcystins were probably released within the intestine, absorbed into the venous bloodstream and accumulated in liver. It is likely that the concentration of microcystins at which the whitefish were exposed did not induce accumulation in other tissues, such as gills or muscles, which are less sensitive. Biotransformation could have promote an efficient elimination of this toxin in these tissues. On the other hand, it must not be excluded that other microcystin congener would be implied in the contamination of the fish. Indeed, the presence of microcystin LR was investigated in this study since this variant is currently considered of more interest to lake or aquaculture managers concerned with health effects on fish and, at today, it is the only variant (while known nearly 80 congeners) for which the World Health Organization determined a value of tolerable daily intake for humans (Sivonen and Jones, 1999). Anyway, other congeners were revealed to be produced by *P. rubescens* in Lake Bourget (Briand et al., 2005). Thus, further investigation on more individuals for microcystin congener contamination, pathological cues and detoxification process are therefore required to estimate whether whitefish population is affected by the toxin at the *P. rubescens* abundances observed in Lake Bourget. However, given the results of the study we can already clearly state that, because of its spatial distribution and diet, made up of zooplankton that can



act as a toxin vector, *P. rubescens* blooms could have health implications for this species.

## Acknowledgements

The authors would like to thank Jean-Christophe Hustache, Michel Colon, and Raphaël D'Elbee for their technical help during field sampling. Many thanks to Sébastien Cachera (CISALB) and Gérard Paolini (the technique cell of Bourget) for their logistical support during field sampling. We are grateful to M. Simon, professional fisherman, for providing whitefish samples. B.S.'s PhD is a CIBLE project funded by the Rhône-Alpes region, the sampling and data analyses were part of "Projet innovant" funded by EFPA (INRA). The ANSES contribution is funded by the General Directorate of Health, Ministry of public health through the Bioaccess Project.[SS]

## References

- Anderson, D., Glibert, P., Burkholder, J., 2002. Harmful algal blooms and eutrophication: nutrient sources, composition, and consequences. *Estuaries Coasts* 25, 704–726.
- Anjos, F.M.D., Bittencourt-Oliveira, M.D.C., Zajac, M.P., Hiller, S., Christian, B., Erler, K., Lucas, B., Pinto, E., 2006. Detection of harmful cyanobacteria and their toxins by both PCR amplification and LC-MS during a bloom event. *Toxicon* 48, 239–245.
- Anneville, O., Gammeter, S., Straile, D., 2005. Phosphorus decrease and climate variability: mediator of synchrony in phytoplankton changes among European peri-alpine lakes. *Freshw. Biol.* 50, 1731–1746.
- Anneville, O., Souissi, S., Ginot, V., Ibanez, F., Druart, J.-C., Angeli, N., 2002. Temporal mapping of phytoplankton assemblages in Lake Geneva: annual and interannual changes in their patterns of succession. *Limnol. Oceanogr.* 47, 1355–1366.
- Balk, H., Lindem, T., 2006. Sonar 4, Sonar 5, Sonar 6 – Post-processing Systems. Operator Manual. University of Oslo, Norway, 427 pp.
- Briand, J.-F., Jacquet, S., Bernard, C., Humber, J.-F., 2003. Health hazards for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems. *Vet. Res.* 34, 361–377.
- Briand, J.-F., Jacquet, S., Flinois, C., Avois-Jacquet, C., Maisonneuve, C., Leberre, B., Humbert, J.-F., 2005. Variations in the microcystin production of *Planktothrix rubescens* (Cyanobacteria) assessed from a four-year survey of Lac du Bourget (France) and from laboratory experiments. *Microb. Ecol.* 50, 418–428.
- Briand, J.-F., Lebourlanger, C., Humbert, J.-F., Bernard, C., Dufour, P., 2004. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) invasion at mid-latitudes: selection, wide physiological tolerance, or global warming? *J. Phycol.* 40, 231–238.
- Bury, N.R., Eddy, F.B., Codd, G.A., 1995. The effects of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*, the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR, and ammonia on growth rate and ionic regulation of brown trout. *J. Fish Biol.* 46, 1042–1054.
- Cazenave, J., Wunderlin, D.A., Bistoni, M.d.I.A., Amé, M.A., Krause, E., Pflugmacher, S., Wiegand, C., 2005. Uptake, tissue distribution and accumulation of microcystin-LR in *Corydoras paleatus*, *Jenynsia multidentata* and *Odontesthes bonariensis*: a field and laboratory study. *Aquat. Toxicol.* 75, 178–190.
- Chen, J., Xie, P., Zhang, D., Ke, Z., et Yang, H., 2006. In situ studies on the bioaccumulation of microcystins in the phytoplanktivorous silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) stocked in Lake Taihu with dense toxic *Microcystis* blooms. *Aquaculture* 261, 1026–1038.
- Chen, J., Zhang, D., Xie, P., Wang, Q., Ma, Z., 2009. Simultaneous determination of microcystin contaminations in various vertebrates (fish, turtle, duck and water bird) from a large eutrophic Chinese lake, Lake Taihu, with toxic *Microcystis* blooms. *Sci. Total Environ.* 407, 3317–3322.
- Christiansen, G., Molitor, C., Philmus, B., Kurmayer, R., 2008. Nontoxic strains of cyanobacteria are the result of major gene deletion events induced by a transposable element. *Mol. Biol. Evol.* 25, 1695–1704.
- Codd, G.A., Morrison, L.F., Metcalf, J.S., 2005. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. *Toxicol. Appl. Pharm.* 203, 264–272.
- Cuypers, Y., Vinçon-Leite, B., Groleau, A., Tassin, B., Humbert, J.-F., 2011. Impact of internal waves on the spatial distribution of *Planktothrix rubescens* (cyanobacteria) in an alpine lake. *ISME J.* 5, 580–589.
- David, J., 1967. Pêche, pêcheurs professionnels, pollution dans le lac du Bourget. *Bull. Fr. Piscic.* 224, 81–94, doi:10.1051/kmae:1967009.
- Deblois, C.P., Aranda-Rodriguez, R., Giani, A., Bird, D.F., 2008. Microcystin accumulation in liver and muscle of tilapia in two large Brazilian hydroelectric reservoirs. *Toxicon* 51, 435–448.
- Deblois, C.P., Juneau, P., 2010. Relationship between photosynthetic processes and microcystin in *Microcystis aeruginosa* grown under different photon irradiance. *Harmful algae* 9, 18–24.
- Degiori, F., Cachera, S., Guillard, J., Raymond, J.C., Verges, C., 2006. Synthèse des études piscicoles effectuées sur le lac du Bourget entrées 2003 et 2005. Etat de santé du peuplement piscicole Facteur limitant ou ralentissant la restauration. Proposition de remédiation et de gestion halieutique. Cisalb, 73 pp.
- Dokulil, M.T., Teubner, K., 2000. Cyanobacterial dominance in lakes. *Hydrobiology* 438, 1–12.
- Dorigo, U., Fontvieille, D., Humbert, J.F., 2006. Spatial variability in the abundance and composition of the free-living bacterioplankton community in the pelagic zone of Lake Bourget (France). *FEMS Microbiol. Ecol.* 58, 109–119.
- Engström-Öst, J., Karjalainen, M., Viitasalo, M., 2006. Feeding and refuge use by small fish in the presence of cyanobacteria blooms. *Environ. Biol. Fishes* 76, 109–117.
- Ernst, B., 2008. Investigations on the impact of toxic cyanobacteria on fish – as exemplified by coregonids in Lake Ammersee. Dissertation. 176 pp.
- Ernst, B., Hitzfeld, B., Dietrich, D., 2001. Presence of *Planktothrix* sp. and cyanobacterial toxins in Lake Ammersee, Germany and their impact on whitefish *Coregonus lavaretus*. *Environ. Toxicol.* 16, 483–488.
- Ernst, B., Hoeger, S.J., O'Brien, E., Dietrich, D.R., 2006. Oral toxicity of the microcystin-containing cyanobacterium *Planktothrix rubescens* in European whitefish (*Coregonus lavaretus*). *Aquat. Toxicol.* 79, 31–40.
- Ernst, B., Hoeger, S.J., O'Brien, E., Dietrich, D.R., 2007. Physiological stress and pathology in European whitefish (*Coregonus lavaretus*) induced by subchronic exposure to environmentally relevant densities of *Planktothrix rubescens*. *Aquat. Toxicol.* 82, 15–26.
- Fischer, W.J., Dietrich, D.R., 2000. Pathological and biochemical characterisation of microcystin-induced hepatopancreas and kidney damage in carp. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 164, 73–81.
- Foot, K.G., Knudsen, H.P., Vestnes, G., MacLennan, D.N., Simmonds, E.J., 1987. Calibration of Acoustic Instruments for Fish-Density Estimation: A Practical Guide. ICES Cooperative Research Report. 144 pp.
- Ghadouani, A., Pinel-Alloul, B., Prepas, E.E., 2003. Effects of experimentally induced cyanobacterial blooms on crustacean zooplankton communities. *Freshw. Biol.* 48, 363–381.
- Granéli, E., Weberg, M., Salomon, P.S., 2008. Harmful algal blooms of allelopathic microalgal species: the role of eutrophication. *Harmful Algae* 8, 94–102.
- Guillard, J., Perga, M.-E., Colon, M., Angeli, N., 2006. Hydroacoustic assessment of young-of-year perch, *Perca fluviatilis*, population dynamics in an oligotrophic lake (Lake Annecy, France). *Fish. Manag. Ecol.* 13, 319–327.
- Humbert, J.F., 2006. Rapport final sur l'étude lourde du lac du Bourget (2004–2005). Rapport INRA-CISALB. 195 pp.
- Humbert, J.F., Paolini, G., Le Berre, B., 2001. Monitoring a cyanobacterial bloom and its consequences for water quality. In: Hallegraeff, G., et al. (Eds.), *Harmful Algal Bloom 2000*. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, pp. 496–499.
- Jacquet, S., Briand, J.-F., Lebourlanger, C., Avois-Jacquet, C., Oberhaus, L., Tassin, B., Vinçon-Leite, B., Paolini, G., Druart, J.-C., Anneville, O., Humbert, J.-F., 2005. The proliferation of the toxic cyanobacterium *Planktothrix rubescens* following restoration of the largest natural French lake (Lac du Bourget). *Harmful Algae* 4, 651–672.
- Jacquet, S., Rimet, F., Girel, C., Perga, M., Paolini, G., Lazzarotto, J., Domaizon, I., Humbert, J.-F., Perny, P., Laine, L., Kerrien, F., 2010. Suivi scientifique de la qualité des eaux du lac du Bourget pour l'année 2009. Rapport 2009. 186 pp.
- Jann-Para, G., Schwob, I., Feuillade, M., 2004. Occurrence of toxic *Planktothrix rubescens* blooms in lake Nantua, France. *Toxicon* 43, 279–285.
- Jewel, M.A.S., Affan, M.A., Khan, S., 2003. Fish mortality due to cyanobacterial bloom in an aquaculture pond in Bangladesh. *Pak. J. Biol. Sci.* 6, 1046–1050.
- Jöhnk, K.D., Huisman, J., Sharples, J., Sommer, B., Visser, P.M., Strom, J.M., 2008. Summer heatwaves promote blooms of harmful cyanobacteria. *Glob. Change Biol.* 14, 495–512.
- Komárek, K., Anagnostidis, K., 2005. Cyanoprokaryota-2. Teil/Oscillatoriales 19/2. In: Büdel, B., Krienitz, L., Gärtner, G., Schagerl, M. (Eds.), *Süßwasserflora von Mitteleuropa*. Elsevier GmbH, München.
- Kurmayer, R., Christiansen, G., Gumpenberger, M., Fastner, J., 2005. Genetic identification of microcystin ecotypes in toxic cyanobacteria of the genus *Planktothrix*. *Microbiology* 151, 1525–1533.
- Lebourlanger, C., Dorigo, U., Jacquet, S., Leberre, B., Paolini, G., Humbert, J.-F., 2002. Application of a submersible spectrofluorometer for rapid monitoring of freshwater cyanobacterial blooms: a case study. *Aquat. Microb. Ecol.* 30, 83–89.
- Ledoux, G., Lajeunesse, P., Chapron, E., St-Onge, G., 2010. Multibeam bathymetry investigations of mass-movements in Lake Le Bourget (NW Alps, France) using a portable platform. In: Mosher, D.C., et al. (Eds.), *Submarine Mass Movements and Their Consequences*, Adv. Nat. Technol. Hazard Res., Springer 28, 423–434.
- Long, B.M., Jones, G.J., Orr, P.T., 2001. Cellular microcystin content in N-limited *Microcystis aeruginosa* can be predicted from growth rate. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 278–283.
- MacLennan, D., Fernandes, P.G., Dalen, J., 2002. A consistent approach to definitions and symbols in fisheries acoustics. *ICES J. Mar. Sci.* 59, 365–369.
- Magalhães, V.F.D., Soares, R.M., Azevedo, S.M.F.O., 2001. Microcystin contamination in fish from the Jacarepaguá Lagoon (Rio de Janeiro Brazil): ecological implication and human health risk. *Toxicon* 39, 1077–1085.
- Malbrouck, C., Kestemont, P., 2006. Effects of microcystins on fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 72–86.
- Masson, S., Angeli, N., Guillard, J., Pinel-Alloul, B., 2001. Diel vertical and horizontal distribution of crustacean zooplankton and Y-O-Y fish in a sub alpine lake: an approach based on high frequency sampling. *J. Plankton Res.* 23, 1041–1060.
- Master, B.J., Rodgers Jr., J.H., Deardorff, T.L., 2002. Risk evaluation of cyanobacteria-dominated algal blooms in a North Louisiana reservoir. *J. Aquat. Ecosyst. Health* 9, 103–114.
- Mehner, T., Busch, S., Helland, I.P., Emmrich, M., Freyhof, J., 2010. Temperature related nocturnal vertical segregation of coexisting coregonids. *Ecol. Freshw. Fish* 19, 408–419, doi:10.1111/j.1600-0633.2010.00424.x.

# Effets de *P. rubescens* et des microcystines sur les populations de corégone (*C. lavaretus*)

758

B. Sotton et al. / Harmful Algae 10 (2011) 749–758

- Neffling, M.-R., Lance, E., Meriluoto, J., 2010. Detection of free and covalently bound microcystins in animal tissues by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Environ. Pollut.* 158, 948–952.
- Oberhaus, L., Briand, J.F., Lebourlangier, C., Jacquet, S., Humbert, J.F., 2007. Comparative effects of the quality and quantity of light and temperature on the growth of *Planktothrix agardhii* and *P. rubescens*. *J. Phycol.* 43, 1191–1199.
- Paerl, H.W., Huisman, J., 2008. Climate: blooms like it hot. *Science* 320, 57–58.
- Paulino, S.R., Valério, E., Faria, N., Fastner, J., Welker, M., Tenreiro, R., Pereira, P., 2009. Detection of *Planktothrix rubescens* (Cyanobacteria) associated with microcystin production in a freshwater reservoir. *Hydrobiology* 621, 207–211.
- Rashidan, K., Bird, D., 2001. Role of predatory bacteria in the termination of a cyanobacterial bloom. *Microb. Ecol.* 41, 97–105.
- Simmonds, J., MacLennan, D., 2005. *Fisheries Acoustics Theory and Practice*, 2nd edn. Blackwell Science, Oxford, 437 pp.
- Sivonen, K., Jones, G., 1999. Cyanobacterial toxins. In: Chorus, I., Bartram, J. (Eds.), *Toxic Cyanobacteria in Water*. E & FN Spon, London, pp. 41–111.
- Soares, R.M., Magalhaes, V.F., Azevedo, S.M.F.O., 2004. Accumulation and depuration of microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) in *Tilapia rendalli* (Cichlidae) under laboratory conditions. *Aquat. Toxicol.* 70, 1–10.
- Tencalla, F.G., Dietrich, D.R., Schlatter, C., 1994. Toxicity of *Microcystis aeruginosa* peptide toxin to yearling rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 30, 215–224.
- Wagner, C., Adrian, R., 2009. Cyanobacteria dominance: quantifying the effects of climate change. *Limnol. Oceanogr.* 54, 2460–2468.
- Walsby, A.E., 2005. Stratification by cyanobacteria in lakes: a dynamic buoyancy model indicates size limitations met by *Planktothrix rubescens* filaments. *New Phytol.* 168, 365–376.
- Welker, M., Von Döhren, H., 2006. Cyanobacterial peptides: nature's own combinatorial biosynthesis. *FEMS Microbiol. Rev.* 30, 530–563.
- Wiegand, C., Pflugmacher, S., 2005. Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review. *Toxicol. Appl. Pharm.* 203, 201–218.
- Wilson, A.E., Sarnelle, O., Tillmanns, A.R., 2006. Effects of cyanobacterial toxicity and morphology on the population growth of freshwater zooplankton: meta-analyses of laboratory experiments. *Limnol. Oceanogr.* 51, 1915–1924.
- Xie, L., Xie, P., Guo, L., Li, L., Miyabara, Y., Park, H.D., 2005. Organ distribution and bioaccumulation of microcystins in freshwater fish at different trophic levels from the eutrophic Lake Chaohu, China. *Environ. Toxicol.* 20, 293–300.

## **3.2 Assimilation rapide de la MC-LR par le corégone : Activité de la GST et génotoxicité**

### **3.2.1 Contexte de l'étude**

La capacité d'un agent toxique à s'accumuler et à entraîner des effets perturbateurs au sein d'un organisme est intimement liée à son assimilation mais également à sa prise en charge par le système de détoxification par l'organisme touché (Van der Oost et al., 2003). Malgré les études déjà réalisées sur l'impact des MCs produites par *P. rubescens* sur le corégone (Ernst et al., 2001, 2006, 2007), aucune ne fait état des cinétiques d'accumulation et de détoxification des MCs par cette espèce, élément pourtant indispensable à l'évaluation des impacts potentiels de ces cyanotoxines sur les populations de corégones des lacs péri-alpins.

Les poissons possèdent un système de détoxification composé de 3 phases. La phase 1 est généralement caractéristique de phénomènes d'oxydations, de réductions et d'hydrolyses de la molécule toxique afin de faciliter sa conjugaison enzymatique au cours de la phase 2. La phase 3 est caractérisée par un catabolisme enzymatique des molécules toxiques en produit plus facilement excrété par l'organisme (Van der Oost et al., 2003). Dans la littérature, de nombreux travaux ont mesuré les effets des cyanotoxines sur l'activité des enzymes de la phase 2 du processus de détoxification (Malbrouck et Kestemont, 2006; Amado et Monserrat, 2010). A l'heure actuelle, l'enzyme de détoxification la plus étudiée chez le poisson est la Glutathion S-transférase (GST), enzyme responsable de la conjugaison des MCs avec le glutathion pour faciliter leur excrétion (Pflugmacher et al., 1998; Amado et Monserrat, 2010). Cette enzyme constitue donc un bon proxy de l'activité du système de détoxification des poissons lors d'un contact avec une substance toxique et renseigne ainsi sur la capacité de détoxification des différentes espèces de poissons. Cependant, le système de détoxification n'est généralement pas apte à détoxifier et excréter la totalité des MCs absorbées par les poissons et ainsi des effets physiologiques importants peuvent apparaître. Les MCs sont principalement considérées comme cytotoxiques et promotrices de tumeurs *via* des phénomènes d'inhibition des protéines phosphatases 1 et 2A lors de leur entrée dans les cellules. Néanmoins, depuis près d'une dizaine d'années, des dommages à l'ADN ont pu être observés principalement chez des mammifères soumis à ces cyanotoxines (Zegura et al., 2011). En revanche, les effets génotoxiques des MCs sur les organismes aquatiques sont encore peu étudiés (Wu et al., 2011; Da Silva et al., 2011). Le

but de cette étude est donc d'évaluer expérimentalement l'accumulation, la detoxification des MCs *via* la mesure de l'activité de la GST ainsi que la génotoxicité de la MC-LR sur des juvéniles de corégones exposés à des concentrations réalistes par gavage. Ces résultats permettront de mieux comprendre les observations réalisées sur le terrain et ainsi d'évaluer plus finement les effets potentiels de ces cyanotoxines sur les populations de corégones.

### 3.2.2 Résumé de l'étude

Des concentrations correspondant à la quantité de MC qui peut être ingérée par le corégone dans le milieu naturel *via* le zooplancton en une journée en début et au cours d'un bloom de *P. rubescens* ont été administrées par gavage à des juvéniles de corégone. Pendant 96 heures, l'accumulation de la MC-LR dans les foies et les muscles de corégones et l'activité hépatique de la GST sont mesurées et les impacts génotoxiques sur les érythrocytes sont évalués. Les résultats montrent que les concentrations en MC-LR équivalent augmentent au cours du temps dans les foies et les muscles de corégones et ceci quelque soit la dose administrée. Néanmoins les concentrations mesurées dans les poissons soumis aux plus fortes concentrations en MC-LR sont toujours plus fortes que celles mesurées dans les poissons soumis aux plus faibles doses quelque soit l'organe étudié. De plus, les concentrations relevées dans les foies sont également toujours plus importantes que celles relevées dans les muscles. Parallèlement, l'activité de la GST est augmentée pendant 24 heures pour la faible dose de MC-LR administrée et 48 heures pour la plus forte. Par ailleurs, la plus forte concentration d'exposition semble induire des dommages à l'ADN du corégone mais qui semble néanmoins partiellement réparés à la fin de l'expérience. Ces résultats suggèrent que malgré l'activation du système de detoxification du corégone suite à l'administration de MC-LR, la cyanotoxine semble capable de s'accumuler dans différents organes du poisson et également d'entraîner des dommages à l'ADN qui semblent néanmoins réversibles. Cette étude démontre que le corégone, poisson emblématique des lacs péri-alpins, peut être impacté par les cyanotoxines suite à l'accumulation rapide de celles-ci et malgré la mise en marche des phénomènes de detoxification. Ainsi dans un contexte de contamination chronique comme dans le cas du lac du Bourget, des perturbations pourraient apparaître dans les populations de corégone.



### 3.2.3 Article 2:

Ecotoxicology  
DOI 10.1007/s10646-012-0913-4

## Short-term uptake of microcystin-LR by *Coregonus lavaretus*: GST activity and genotoxicity

Benoît Sotton · Alain Devaux · Nicolas Givaudan ·  
Jean Guillard · Isabelle Domaizon ·  
Sylvie Bony · Orlane Anneville

Accepted: 7 April 2012  
© Springer Science+Business Media, LLC 2012

**Abstract** In the present study, juvenile whitefish weighing 2 g were exposed by force-feeding to two ecologically relevant doses (0.05 and 0.5 µg per fish) of microcystin-LR (MC-LR). Then over 96 h the MC uptake in fish liver and muscle was measured, as the activity of the detoxification enzyme glutathione S-transferase (GST) in the liver, and the genotoxicity impact on red blood cells. Results show that (1) the MC-LR equivalent concentrations increased for both doses and in both organs of whitefish with approximately threefold lower concentrations for the low dose

compared to the high dose in both organs and threefold lower concentrations in the muscle compared to the liver for each dose (2) the liver GST activity increased during the first 48 h of exposure with fivefold higher GST activity for the highest dose at 48 h compared to control and (3) MC-LR leads to deoxyribonucleic acid strand breaks that were detected by the comet assay and shown to be partially repaired. This work demonstrates that European whitefish could be impacted by cyanobacteria toxins due to rapid microcystin uptake, especially in the context of chronic contamination, which can occur during long bloom episodes.

**Keywords** Microcystin · Coregonids · Cyanobacteria · Detoxification · GST · Genotoxicity

B. Sotton (✉) · N. Givaudan · J. Guillard · I. Domaizon ·  
O. Anneville  
INRA, UMR CARRTEL, 75 av. de Corzent,  
74203 Thonon Les Bains, France  
e-mail: benoit.sotton@thonon.inra.fr

N. Givaudan  
e-mail: nicolas.givaudan@univ-rennes1.fr

J. Guillard  
e-mail: jean.guillard@thonon.inra.fr

I. Domaizon  
e-mail: isabelle.domaizon@thonon.inra.fr

O. Anneville  
e-mail: orlane.anneville@thonon.inra.fr

A. Devaux · S. Bony  
LEHNA, UMR 5023, ENTPE, Université de Lyon,  
3 rue Maurice Audin, 69518 Vaulx en Velin Cedex, France  
e-mail: alain.devaux@entpe.fr

S. Bony  
e-mail: bony@entpe.fr

N. Givaudan  
UMR CNRS Ecobio 6553, Université de Rennes 1,  
Campus de Beaulieu, 265 Avenue du Général Leclerc,  
35042 Rennes Cedex, France

### Introduction

In a context of global warming, the number of occurrences of cyanobacterial blooms is increasing worldwide (Paerl and Huisman 2008). Many genera of cyanobacteria are able to produce hepatotoxins, which are known to cause various ecosystem disturbances. Microcystins (MCs) are the most-studied hepatotoxins and exhibit more than 80 identified variants (Welker and Von Döhren 2006). In addition to studies of the phytoplanktonic (Pflugmacher 2002) and zooplanktonic (Wilson et al. 2006) communities, extensive research is now being focused on the impact of these toxins on fish (reviewed by Malbrouck and Kestemont 2006). Direct consequences of exposure to the microcystin-LR (MC-LR), the most toxic variant (Martins and Vasconcelos 2009), have been revealed in various fish species (Malbrouck and Kestemont 2006). Indeed, MC-LR acts as a potent and specific inhibitor of the protein phosphatases

1 (PP1) and 2A (PP2A) (MacKintosh et al. 1990). Phosphatase inhibition leads to an intracellular hyperphosphorylation, which is responsible for a large array of cellular damage, including cytoskeleton alterations and apoptosis (reviewed by Campos and Vasconcelos 2010).

Moreover, MCs have been shown, first in mammals, to increase the formation of reactive oxygen species (ROS) and, consequently, oxidative DNA damage (for a review, see Zegura et al. 2011). Many authors suggest that oxidative stress stemming from exposure to MCs may arise in fish as well, but the link to further DNA damage remains to be better established for aquatic species (Amado and Montserrat 2010). As a whole, MCs can interfere with DNA damage repair pathways, which, along with DNA damage, can lead to cancers. Also, behavioural (Baganz et al. 2004), histological (Ernst et al. 2006) and physiological (Ernst et al. 2006, 2007) studies on various fish species have demonstrated the deleterious effects of MC-LR exposure that could lead to potential disorders in fish population dynamics. Furthermore, MC accumulation has been pointed out in various fish species, particularly in the liver and muscle tissues (Cazenave et al. 2005; Martins and Vasconcelos 2009; Malbrouck et al. 2003).

However, fish possess a three-phase detoxification system enabling them to detoxify many xenobiotics, including the cyanobacterial toxins (Van der Oost et al. 2003). The most-studied detoxification enzymes in fish exposed to MCs are the glutathione-S-transferases (GSTs). They are implicated in the second phase of detoxification where they drive the conjugation of MCs to glutathione (GSH) (Pflugmacher et al. 1998). Thus, a better understanding of accumulation and detoxification processes in fish is required to understand the potential impacts of cyanobacteria and their toxins on fish populations in ecosystems.

In the peri-Alpine region, seasonal metalimnic blooms of MC producers such as *Planktothrix rubescens* occur in several lakes (Anneville et al. 2004; Briand et al. 2005; Ernst et al. 2006). This cyanobacterium is known to produce predominantly MC-LR and MC-RR toxins (Briand et al. 2005). In these peri-alpine lakes, fishing is a professional and recreational activity, and fishing pressure is particularly focused on the European whitefish (*Coregonus lavaretus* L.), a zooplanktivorous species, which is highly commercialised for human consumption. Because of its thermal preference, the whitefish is found below the thermocline, in the metalimnion (Mehner et al. 2010) exposing this species to *P. rubescens* metalimnic blooms during the summer (Sotton et al. 2011). Thus, the vertical position of whitefish facilitates contact with *P. rubescens* filaments in different ways such as by direct ingestion of *P. rubescens* filaments (Sotton et al. 2011) or ingestion of MC-contaminated zooplankton. However, knowledge about the

accumulation, detoxification and genotoxicity of the cyanobacterial toxins is still scarce for this species.

Controlled systems are of special interest in order to investigate these issues. Thus, an experimental study was performed to assess some of the toxicological processes due to MC exposure in *C. lavaretus*. The aims of this study were (1) to determine accumulation kinetics in the liver and muscle tissues of *C. lavaretus* subjected to two ecologically relevant MC-LR doses; (2) to evaluate in the liver the activity of the GST involved in MC-LR biotransformation; and (3) to assess the genotoxicity potential of MC-LR and its possible link with oxidative stress in *C. lavaretus* blood.

## Materials and methods

### Animals

The study was conducted on juveniles of *C. lavaretus* with average length of  $7.15 \pm 0.74$  cm and average weight of  $2.04 \pm 0.66$  g (max: 2.73 g, min: 1.31 g). The fish were obtained from eggs collected on Lake Bourget, France, during the winter of 2009 and reared in spring water at 12 °C, under natural light and with oxygen concentration around  $10 \text{ mg l}^{-1}$  in the Rives fish farm at Thonon-les-Bains, France.

### Experimental design

The experiment was performed in triplicate. For each replicate, 400 whitefish, starved for 24 h prior to handling, were removed from the fish farm and acclimated for 24 h before the experiment in 5 l aquaria at 12 °C with 20 individuals per aquarium. The aquariums were filled with tap water previously oxygenated for 48 h to remove chlorine. Before the force-feeding, all fish (control and treated fish) were anaesthetised in water containing  $300 \mu\text{l l}^{-1}$  of Propiscin (0.2 %). Then, the treated fish were force-fed once individually with a catheter connected to a Hamilton syringe. MC-LR, purchased from the Gentaure Corporation (France), was dissolved in MilliQ water and subsequently diluted in phenol red (0.04 %) to verify that the force-feeding was successful. The MC concentrations of the force-feeding solutions were verified by HPLC-PDA.

After force-feeding, the fish were kept at 12 °C with a light/dark cycle of 12/12 h, pH  $7.8 \pm 0.3$  and dissolved oxygen concentration maintained at  $\sim 9 \text{ mg l}^{-1}$  with an air pump (SECOH SLL-50) during experiment. No food was given to the fish throughout the experiment. Every 24 h, 90 % of the water was renewed with tap water that had been previously cooled to 12 °C and dechlorinated.



## Exposure and sampling

The environmentally relevant concentrations of 0.05 and 0.5 µg of MC-LR per fish were chosen for the experiment, based on earlier work. The accumulation of MCs by zooplankton in Canadian lakes and in a Brazilian lagoon has already been reported in field studies with concentrations between 0.3 and 67 µg g<sup>-1</sup> dry weight of zooplankton (Kotak et al. 1996; Ferrão-Filho et al. 2002) and between 0.07 and 3.5 µg g<sup>-1</sup> dry weight of zooplankton when *P. rubescens* is present in Lake Bourget (unpublished data). Furthermore, similar analyses on cladocerans carried out in experimental conditions have shown MC concentrations reaching 1.1 µg g<sup>-1</sup> fresh weight for cladocerans fed with cyanobacterial concentrations equivalent to those measured during summer blooms in Lake Bourget (unpublished data). Thus, zooplankton, and particularly cladocerans, which are consumed by whitefish, could be important vectors of toxins (Smith and Haney 2006).

Following the equation, proposed by Karjalainen et al. (1997), to estimate the maximum daily food consumption of whitefish, a two-gram juvenile fish ingests around 0.4 g of food per day. Knowing that cladocerans of Lake Bourget, which are the most abundant taxon during the summer, are able to accumulate MCs, fish weighing 2 g could ingest approximately from 0.05 µg of MCs per day at the beginning of the bloom to 0.5 µg of MCs per day during the bloom. Despite the fact that a daily intake of whitefish is generally constituted by several food intake times (mainly at dawn and dusk), force-feeding was done once to avoid possible injuries and/or stress related to the fish manipulation.

For each replicate, one hundred fish ( $n = 20$ /sampling time) were each force-fed with 10 µl of a 5 mg l<sup>-1</sup> MC solution (i.e., 0.05 µg of MC-LR per fish) and another 100 fish ( $n = 20$ /sampling time) with 10 µl of a 50 mg l<sup>-1</sup> MC solution (i.e., 0.5 µg of MC-LR per fish). As a placebo treatment, 100 fish ( $n = 20$ /sampling time) were force-fed with 10 µl of a 0.04 % non-toxic neutral solution of phenol red to evaluate the effect of phenol red on the measured endpoints. Finally, 100 fish ( $n = 20$ /sampling time) were not force-fed and were used as a control treatment. These four treatments were conducted 3 times in order to have replicates. Subsequently, at 6, 12, 24, 48 and 96 h, survival fish for each treatment and replicate were killed, then weighed, measured and dissected. Muscles were sampled on each fish, then pooled and stored at -80 °C before analysis. The liver from each fish was sampled, and cut into two equal parts to constitute two pools: one for MC analysis and one for enzymatic measurement and stored at -80 °C before analysis.

Additionally, for each treatment, each sampling time and replicate, blood of six fish was individually collected in

a heparinized syringe via caudal vein puncture. Blood samples were diluted 100-fold in a cryopreservative buffer (250 mM sucrose, 40 mM trisodium citrate, 5 % dimethyl sulfoxide (DMSO) adjusted to pH 7.6 with 1 M citric acid), deep-frozen in liquid nitrogen and then stored separately at -80 °C prior to processing.

## Microcystin extraction and analysis

The pooled livers and muscles were homogenised in 100 % methanol. Then, all samples were sonicated in an ultrasonic bath (Elma Sonic) for 5 min and centrifuged (Beckman AVANTI J30 I) at 24,000×g for 45 min at -5 °C to precipitate the co-extracted proteins. This extraction procedure was repeated twice. Then, both of the supernatants of each extraction were collected with a 5 ml syringe and washed with hexane; the methanol layer was filtered through a 0.2 µm syringe filter (PTFE, Whatman) and then pooled and evaporated at 40 °C to dryness with a Speedvac device (Speed-vac Plus SC110A, Savant). Finally before ELISA analysis, dry extracts were dissolved in an adequate volume of Milli-Q water, which varied among the samples.

The recovery rate for the extraction procedure was calculated from 300 mg samples of whitefish liver ( $n = 3$ ) and muscle ( $n = 3$ ) spiked with 1 µg of pure MC-LR. Recovery rates reached 87 ± 4.4 % for liver and 78 ± 11.1 % for muscle. An ELISA analysis was performed according to the MCs (Adda-specific) Plate Kit (Abraxis LLC). The absorbance was determined in a microplate reader (Dynex MRX II, Dynex Technologies, Inc, USA) at a wavelength of 450 nm. The results are reported as nanograms of MC-LR equivalents per gram of organ fresh weight (FW). This quantification method was chosen for its sensitivity and specificity to analyse free MC concentrations. However this quantification method, targeting molecules that possess an unusual β-amino acid, ADDA (4*E*,6*E* 3-amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4,6-dienoic acid), does not allow us to discriminate the pure MC-LR from its less toxic metabolites and may lead to an overestimation of the pure MC-LR concentrations.

## Enzyme extraction and measurement

The samples of liver were homogenised in cold phosphate buffered saline (PBS) and centrifuged at 10,000×g for 15 min at 4 °C. The supernatant was collected, and the protein content was measured by spectrophotometry at 595 nm (Varian Cary 50 Spectrophotometer, Agilent Technologies, USA). Glutathione S-transferase activities were determined by fluorometry following the guidelines of the GST Fluorometric assay kit (Biovision, USA). The fluorescence was determined in a microplate reader



(Fluoroskan Ascent FL, Thermo Fisher Scientific, France) at 380 nm excitation and 460 nm emission wavelengths. The results are reported in U per milligram of total protein, with U equal to the enzyme quantity that catalyses the transformation of 1  $\mu\text{mol}$  of substrate per minute.

#### Assessment of DNA damage

The DNA damage was measured on the stored blood of 18 individual fish per treatment and sampling time. Damage was measured in the DNA of erythrocytes using the alkaline comet assay according with slight modifications. The blood cells were rapidly thawed just before the comet assay, the cell density was adjusted to  $10^3$  cells  $\text{l}^{-1}$  of cold PBS and the cell viability was checked by the Trypan blue exclusion method. In all experiments, the viability of cells was found to be  $>95\%$ . Microscope slides were immersed in melted normal agarose prepared in PBS (0.8 % final concentration) and dried overnight at room temperature. An aliquot of 50  $\mu\text{l}$  of 1 % low melting point agarose in PBS mixed with an equal volume of cell suspension was spread on the slide, and a coverslip was added. After agarose solidification on an ice-chilled plate, a second layer was made with 90  $\mu\text{l}$  of 0.5 % low melting point agarose spread on the previous layer, a coverslip was added and the slides were again allowed to solidify. The steps following were carried out under dim red light to prevent artificial DNA damage. The cells were treated with a lysing solution (2.5 M NaCl; 0.1 M EDTA; 10 mM Tris, pH 10; 1 % (v/v) Triton X-100; and 10 % (v/v) DMSO) for 1 h at 4 °C, and then the DNA was allowed to unwind for 40 min in the electrophoresis buffer (0.3 M NaOH, 1 mM EDTA, pH  $>13$ ). The electrophoresis was run for 24 min at 20 V and 300 mA (0.6 V  $\text{cm}^{-1}$ ). The slides were then neutralised using Tris buffer (0.4 M Tris, pH 7.5) and dried for 15 min in absolute ethanol.

The DNA was stained with 0.05 mM ethidium bromide and scored using an Axioskop epifluorescence microscope (Zeiss, Germany) and the Comet Assay IV image analysis system (Perceptive Instruments Ltd., UK). 50 randomly selected cells from two replicate slides were analysed for a total of 100 cells. Of the comet parameters, the tail intensity, which reflects the percentage of tail DNA, is the most relevant. Comet figures that showed an extremely prominent tail lacking a clearly identifiable head were excluded from the analysis because they can originate from necrosis or apoptotic processes.

#### Statistical analysis

Non-normal data on survival rates, MC-LR accumulation, GST activity and DNA damage were analysed by both Kruskal–Wallis (more than two groups, i.e. 5 time

intervals) and Mann–Whitney (two groups) nonparametric tests. Statistical tests were not performed for the MC accumulation and GST activity at 96 h due to a high mortality from unknown causes in all treatments and controls in one of the replicates. Significant differences were determined at the  $P < 0.05$  level for all of the statistical analyses. The statistical analyses were run with the software XLSTAT 2011.

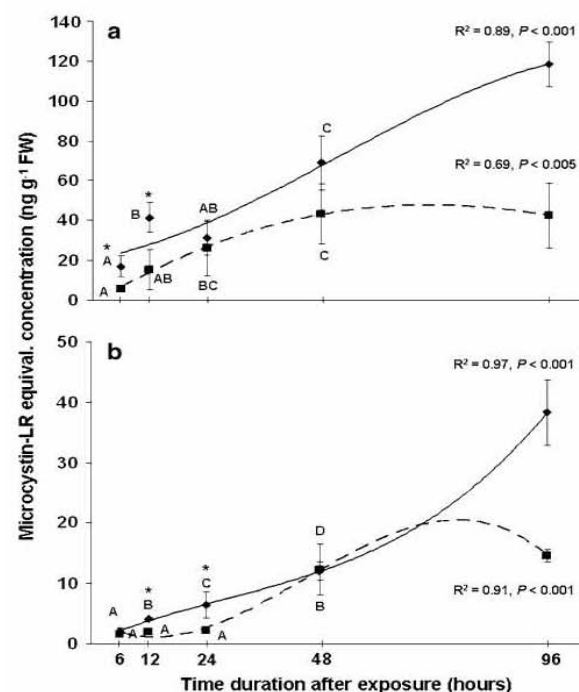
## Results

#### Whitefish survival rate

During the experiment, the survival rate of experimental fish was always comprised between 80 and 100 % except at 96 h in one replicate where a high mortality was observed whatever the treatment. A comparison between the control and placebo treatments was performed to highlight the potential effect of force-feeding on the whitefish survival rates. At any of the sampling times, no significant differences between the control and placebo treatments were found. Furthermore, no significant change in survival rate was shown either between control treatments and both MC doses or placebo treatments and both MC doses.

#### Accumulation of MC-LR equivalent in liver and muscle tissues

For control and placebo treatments, the concentration in MC-LR was always below the detection limit ( $0.15 \mu\text{g l}^{-1}$ ) of ELISA measurements (results not shown). Whitefish force-fed with MC-LR at 0.5 and  $0.05 \mu\text{g/fish}$  accumulated the toxin both in liver (Fig. 1a) and muscle tissues (Fig. 1b) during the time of the experiment. Fig. 1a, b show that the toxin was present in liver and muscle tissues 6 h after the force-feeding of both doses. Significant differences were detected between the two MC-LR doses at 6 and 12 h and at 12 and 24 h in the liver and muscles, respectively. At the highest dose, a trend for higher accumulation was visible after 48 and 96 h in the liver and after 96 h in muscles, but this trend was not statistically significant. Furthermore, significant differences were found between the different sampling times for each dose with an increase in toxin equivalents concentration in the two tissues, except between 48 and 96 h for both doses (Fig. 1a, b). The difference in concentration between 48 and 96 h was not statistically significant due to the low number of values for 96 h. However, at the highest dose, an increase was noted between these sampling times, but this increase was not found at the lowest dose, for which a plateau was reached after 48 h (Fig. 1a, b). At the end of the

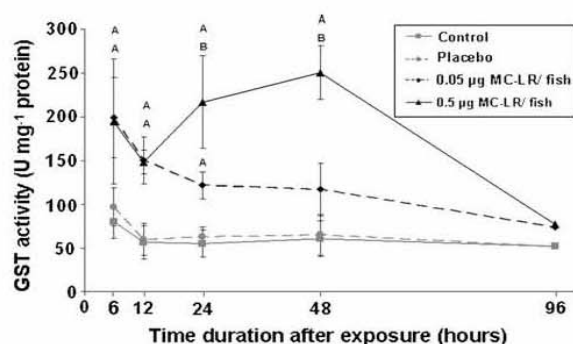


**Fig. 1** Accumulation of MC-LR in liver (a) and muscle (b) of whitefish (*Coregonus lavaretus*) under two relevant doses, 0.5 µg/fish (diamond, full line) and 0.05 µg/fish (square, dotted line). Mean values ( $n = 3$  tanks/treatment) are presented on the figure with error bars indicating standard deviations. Regression curves were done using raw data at each sampling points. \* correspond to significant differences (Mann-Whitney,  $P < 0.05$ ) observed for the comparison between microcystin treatments. Different letters correspond to significant differences between sampling times for each dose (Kruskal-Wallis followed by a multiple pairwise comparisons of Conover-Iman,  $P < 0.05$ ). Concentrations of MC-LR equivalent are expressed as ng g<sup>-1</sup> of liver and muscle fresh weight

experiment, the MC-LR equivalents concentrations reached approximate values of 120 ng g<sup>-1</sup> FW and 30–50 ng g<sup>-1</sup> FW in the liver and approximate values of 40 ng g<sup>-1</sup> FW and 15 ng g<sup>-1</sup> FW in muscle tissues at the highest and the lowest doses, respectively.

#### Analysis of GST activity in liver

Glutathione S-transferase activities were similar for each sampling time in the control and placebo treatments (Fig. 2). Thus, red phenol had no effect on the GST activity. At 6 and 12 h during the experiment, the GST activity was similar in the exposed fish regardless of the MC dose but was significantly higher than the GST activity measured in the control group (Fig. 2). From 24 h on, a significant divergence appeared in the GST values



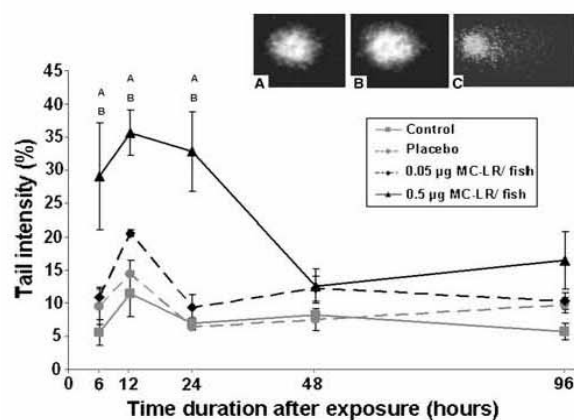
**Fig. 2** Glutathione S-transferase (GST) activity in liver of whitefish (*Coregonus lavaretus*) gavaged with two relevant doses of MC-LR (0.05 µg and 0.5 µg/fish). Mean values ( $n = 3$  tanks/treatment) are presented on the figure with error bars indicating standard deviations. Letter “A” corresponds to significant differences (Mann-Whitney,  $P < 0.05$ ) observed for the comparison of different treatments to control group values. Letter “B” corresponds to significant differences (Mann-Whitney,  $P < 0.05$ ) observed for the comparison between microcystin treatments. The GST activity is expressed as U mg<sup>-1</sup> proteins

measured in the two MC treatments, although these values were still significantly higher than in controls. At 48 h, no significant difference in GST activity was found between the lowest MC-LR concentration and the control, while significant differences were still measured at the highest MC-LR concentration compared to the control and to low-dose MC-LR treatment (Fig. 2). No statistical tests were performed at 96 h due to the low number of values ( $n = 2$ ) for each treatment, but no difference seemed to appear between the control and MC-LR treatments at this sampling time (Fig. 2).

#### Analysis of DNA damage in whitefish erythrocytes

Figure 3 illustrates typical photomicrographs of the erythrocyte nuclei of whitefish observed after processing the single-cell gel electrophoresis assay. Comet figures obtained from the blood samples of the MC-LR treated fish clearly exhibit higher damage than those from the control or placebo fish. The basal DNA damage measured in erythrocytes from the control and placebo whitefish was in the same range, between 6 and 14 % tail DNA (Fig. 3). After the 0.5 µg/fish MC-LR treatment, a significant five-fold increase in DNA damage compared to the control was observed from 6 to 24 h after the initial force-feeding, followed by a decrease to the control values. Although not significant ( $P = 0.057$ ), a trend in DNA damage induction was noted at 12 h after fish contamination at the low MC-LR dose of 0.05 µg/fish.





**Fig. 3** DNA damage in whitefish erythrocytes measured through the comet assay. Mean values ( $n = 18$  blood samples/treatment/sampling time) are presented on the figure with error bars indicating standard deviations. Letter "A" corresponds to significant differences (Mann-Whitney,  $P < 0.05$ ) observed for the comparison of different treatments to control group values. Letter "B" corresponds to significant differences (Mann-Whitney,  $P < 0.05$ ) observed for the comparison between microcystin treatments. At the top right, comet photomicrographs of whitefish erythrocyte nuclei are presented with a control fish; b placebo fish; c nuclei from MC-LR treated fish exhibiting increased DNA migration.

## Discussion

During the experiment, no significant difference was detected between the control and placebo survival rates, showing that no mortality occurred as a result of force-feeding. Furthermore, no mortality due to MC-LR exposure was observed. The MC-LR concentrations used here ranged between  $20 \mu\text{g kg}^{-1}$  body weight (low dose) and  $200 \mu\text{g kg}^{-1}$  body weight (high dose) given by force-feeding and are too low to induce fish mortality according to the literature (reviewed by Malbrouck and Kestemont 2006). In trout, the median lethal concentration (LC50) was indeed evaluated at  $550 \mu\text{g kg}^{-1}$  body weight after intraperitoneal injection (Tencalla et al. 1994). Toxin administration orally could also lead to a lower toxicity than the intraperitoneal injection (Tencalla et al. 1994).

After a force-feeding with two environmentally relevant doses, the MC-LR equivalents accumulate rapidly in liver and muscle tissues of whitefish juveniles. In both tissues, the MC-LR equivalents were detected after 6 h of the experiment with significantly higher concentrations in the liver at the highest dose of MC-LR administered. Furthermore, the MC-LR equivalents concentration increased during all the experiment for the highest MC-LR dose and during 48 h for the lowest dose. The fast accumulation of MC-LR equivalents in the liver and muscles was similar to results obtained from other species. Williams et al. (1997)

studied the distributions of  $^{14}\text{C}$ -labelled MC-LR in the liver and flesh of the Atlantic salmon (*Salmo salar*). Two hours after an intraperitoneal injection, MC-LR was detected in the liver and muscle of this fish. Furthermore, Tencalla et al. (1994) showed that after force-feeding with pure MC-LR, at higher concentrations than in our experiment, rapid histological damages (after 3 h) are present in liver of yearling trout. However, results on MC-LR accumulation are not really consistent with previous studies. Indeed, Williams et al. (1997) showed in the Atlantic salmon, an increase of MC-LR during the first 5 h of experiment followed by slight decrease until the end of experiment. While Lei et al. (2008) showed a decrease in MC-LR concentrations in the liver of crucian carp during 48 h of experimentation. Several factors could explain the difference in accumulation kinetics between both experiments. Firstly, the difference in the MC-LR measurement methods. In this study, the ADDA-specific ELISA kits were used to determine MC-LR concentrations in liver and muscle tissues of the whitefish. This method targets all molecules that possess an unusual  $\beta$ -amino acid, ADDA (4E,6E 3-amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4,6-dienoic acid). Thus, all of the concentration values given in our study are expressed in MC-LR equivalents per gram of organs including the pure MC-LR and probably also less toxic detoxification compounds (Metcalf et al. 2000) and leading to an overestimation of the real concentrations of pure MC-LR in whitefish organs. Secondly, the use of different fish species between the two experiments (Lei et al. 2008; and this study). Finally, the age of fish used in each experiment: indeed, detoxification enzyme activity rates in adult fish are higher than in juvenile fish (Oliveira et al. 2009) leading to a better elimination of the xenobiotics.

However, it's important to know that reliable comparisons between experimental studies are difficult to make because accumulation processes depend on biological factors such as fish species and detoxification efficiency but also on methodological factors such as MC variants, extraction methods, toxin routes of exposure and experiment time duration.

The GST is probably the most-studied detoxification enzymes in toxicology studies on fish exposed to MC. It is a phase II enzyme of the detoxification processes implicated in the conjugation of MCs with GSH (Pflugmacher et al. 1998). The results of this study show that the GST activity is significantly higher in MC-treatments than in control and placebo treatments during the first 24 h at the lowest dose of MC-LR administered and during 48 h at the highest dose. These results suggest that MC-LR induces an increase in GST activity, which could be explained by the hyperphosphorylation resulting from PP1 and PP2A inhibitions by MCs. This hyperphosphorylation state increases the mean life of the transcription factor Nrf2 that increases



GST activity (Amado and Montserrat 2010). Furthermore, highest GST activities were observed at 24 and 48 h for the high MC-LR dose compared to the low MC-LR dose. Knowing that the low dose is tenfold lower than the high dose, this result is probably responsible of the detoxification of an important MC-LR part leading to a 3 time less MC-LR accumulation at 96 h for the high MC-LR dose.

Several fish studies are in agreement with an increase in liver GST activity following a contact with pure MC-RR (Cazenave et al. 2006b), with extracted MCs (Li et al. 2007b), or in bloom conditions (Li et al. 2007a). However, other studies have shown a decrease (Best et al. 2002; Cazenave et al. 2006a) or no change (Malbrouck et al. 2003) in the GST activity following different ways of exposure to this toxin of fish embryo and juvenile stages. These different GST response patterns could be due to the experimental conditions or different antioxidant responses among fish species to the MC. In our case, despite the observed GST activity increase, MC equivalents accumulated in both liver and muscle tissues of whitefish. This result argues for MC accumulation probably due to a decrease in intracellular GSH and not to a decreased or an unchanged GST activity. The loss of intracellular GSH can be linked to two main reasons. Firstly, an efflux of GSH during the MC cell uptake caused by a group of membrane carriers, the organic anion transporting polypeptides (OATPs) (reviewed by Amado and Montserrat 2010; Fischer et al. 2005). Secondly, the binding of MCs to the beta subunit of ATP-synthase, an enzymatic protein complex implicated in the formation of ATP, affecting ATP-consuming reactions such as GSH synthesis and leading to a decrease in intracellular GSH concentration as proposed by Amado and Montserrat (2010). Then, the intracellular GSH depletion could be involved in a decrease in the MCs conjugation reaction by the GST activity and explain the organ accumulation of the MC-LR despite the increase in GST activity in this study.

Furthermore, at 96 h, there is no visible difference in GST activity between the control and MC-LR treatments. This result suggests that MC-LR temporarily induces GST activity in whitefish following an oral exposure to MC-LR.

In the present study, transient but clear DNA damage has been shown in the erythrocytes of MC-LR exposed whitefish. Genotoxic stress was observed in whitefish erythrocytes at the highest MC-LR dose used (0.5 µg/fish). This finding suggests possible drastic effects on fish during this crucial period. It is important to note that during the 24 h after force-feeding, the DNA damage trend follows that of the GST activity. Then the sharp decrease in DNA damage found after 48 h up to 96 h matches that of the GST activity after 96 h. The GST activity requires reduced GSH, and it has been shown that oxidative DNA damage stemming from MCs is mediated by the modulation of

intracellular GSH content, which is known to play a central protective role against ROS (Zegura et al. 2011). Such a MC-induced oxidative stress involving GSH and enzymatic antioxidant defences has been clearly demonstrated in fish (Prieto et al. 2006). The mechanism of the MC-mediated induction of ROS appears to be complex. First, it is known that MCs are incorporated into the cell via organic anion transporting polypeptides via GSH exchange that induces loss of intracellular GSH, reducing the detoxification capability of the cell (Amado and Montserrat 2010). This reduction could have caused a decrease in ROS scavenging that finally led to the increase in DNA damage observed here in whitefish erythrocytes and that previously described in mammals (Zegura et al. 2004). Second, MC-mediated phosphorylation activates GST, and it can be hypothesised that this phosphorylation contributes to a depletion of GSH followed by an increase in DNA damage. The further decrease in DNA damage shown after 48 h could be explained by DNA repair and/or loss of apoptotic erythrocytes.

In conclusion, despite the increase in GST activity, MC-LR equivalents are rapidly accumulated both in the liver and muscle tissues of the whitefish. These results show that whitefish accumulates MC-LR and could be impacted by the presence of cyanobacteria in ecosystems. However, due to the method used in the present study for analysing MC-LR, a potential overestimation of MC-LR concentrations measured in both organs cannot be excluded. Similar investigations must be performed using juveniles and adult whitefish to identify the different detoxification products present in organs that could contribute to deleterious effects although MCs metabolites are known to be less toxic than the parent compounds (Metcalf et al. 2000). For that purpose, more specific methods such as liquid chromatography or mass spectrometry should be used to discriminate detoxification compounds from pure MC-LR. Furthermore, only free MC has been analysed here when it is known that the majority of MC is covalently linked to protein phosphatases PP1 and PP2A (Williams et al. 1997). Thus, to estimate more accurately the toxin levels in fish, the covalent-binding MC needs to be investigated. During a bloom episode, whitefish are in permanent contact with *P. rubescens* and consequently with its toxins (Sotton et al. 2011). Consequently, fish could accumulate MC through chronic contaminations to even higher concentrations than those found in this study where only the free MC was quantified. Finally, the experimental MC-LR accumulation in whitefish has probably led to a decrease in the intracellular GSH content and to subsequent ROS generation and cell apoptosis. Thus, histological, behavioural and physiological modifications could occur and further disturb whitefish populations. Regarding MC-LR genotoxicity, the GSH content should be measured in target cells and an

Fpg-modified comet assay, which improves the detection of oxidised purines, should be used in future experiments to gain a better knowledge of the underlying mechanism of MC-LR genotoxicity in fish.

**Acknowledgments** The authors would like to thank Cyrille Châtaignier (Rives fish farm), Laury Bouvet, Laurent Espinat and Philippe Laurent for their technical help during experiment. B.S.'s PhD is a CIBLE project funded by the Rhône-Alpes region. N.G.'s CDD and experiments were financed by ONEMA (Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques).

## References

- Amado LL, Montserrat JM (2010) Oxidative stress generation by microcystins in aquatic animals: why and how. *Environ Int* 36:226–235
- Anneville O, Souissi S, Gammeter S, Straile D (2004) Seasonal and inter-annual scales of variability in phytoplankton assemblages: comparison of phytoplankton dynamics in three peri-alpine lakes over a period of 28 years. *Freshw Biol* 49:98–115
- Baganz D, Staaks G, Pflugmacher S, Steinberg CEW (2004) Comparative study of microcystin-LR-induced behavioral changes of two fish species, *Danio rerio* and *Leucaspis deloneatus*. *Environ Toxicol* 19:564–570
- Best JH, Pflugmacher S, Wiegand C, Eddy FB, Metcalf JS, Codd GA (2002) Effects of enteric bacterial and cyanobacterial lipopolysaccharides, and of microcystin-LR, on glutathione S-transferase activities in zebra fish (*Danio rerio*). *Aquat Toxicol* 60:223–231
- Briand JF, Jacquet S, Flinois C, Avois-Jacquet C, Maisonneuve C, Leberre B, Humbert JF (2005) Variations in the microcystin production of *Planktothrix rubescens* (Cyanobacteria) assessed from a four-year survey of Lac du Bourget (France) and from laboratory experiments. *Microb Ecol* 50:418–428
- Campos A, Vasconcelos V (2010) Molecular mechanisms of microcystin toxicity in animal cells. *Int J Mol Sci* 11:268–287
- Cazenave J, Wunderlin DA, Bistoni MDLA, Amé MV, Krause E, Pflugmacher S, Wiegand C (2005) Uptake, tissue distribution and accumulation of microcystin-RR in *Corydoras paleatus*, *Jenynsia multidentata* and *Odontesthes bonariensis*: a field and laboratory study. *Aquat Toxicol* 75:178–190
- Cazenave J, Bistoni MDLA, Pesce SF, Wunderlin DA (2006a) Differential detoxification and antioxidant response in diverse organs of *Corydoras paleatus* experimentally exposed to microcystin-RR. *Aquat Toxicol* 76:1–12
- Cazenave J, Bistoni MDLA, Zwirnmann E, Wunderlin DA, Wiegand C (2006b) Attenuating effects of natural organic matter on microcystin toxicity in zebra fish (*Danio rerio*) embryos—benefits and costs of microcystin detoxication. *Environ Toxicol* 21:22–32
- Ernst B, Hoeger SJ, O'Brien E, Dietrich DR (2006) Oral toxicity of the microcystin-containing cyanobacterium *Planktothrix rubescens* in European whitefish (*Coregonus lavaretus*). *Aquat Toxicol* 79:31–40
- Ernst B, Hoeger SJ, O'Brien E, Dietrich DR (2007) Physiological stress and pathology in European whitefish (*Coregonus lavaretus*) induced by subchronic exposure to environmentally relevant densities of *Planktothrix rubescens*. *Aquat Toxicol* 82:15–26
- Ferrão-Filho ADS, Kozłowsky-Suzuki B, Azevedo SMFO (2002) Accumulation of microcystins by a tropical zooplankton community. *Aquat Toxicol* 59:201–208
- Fischer WJ, Altheimer S, Cattoni V, Meier PJ, Dietrich DR, Hagenbuch B (2005) Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin. *Toxicol Appl Pharmacol* 203:257–263
- Karjalainen J, Miserque D, Huuskonen H (1997) The estimation of food consumption in larval and juvenile fish: experimental evaluation of bioenergetics models. *J Fish Biol* 51:39–51
- Kotak BG, Zurawell RW, Prepas EE, Holmes CFB (1996) Microcystin-LR concentration in aquatic food web compartments from lakes of varying trophic status. *Can J Fish Aquat Sci* 53:1974–1985
- Lei H, Xie P, Chen J, Liang G, Dai M, Zhang X (2008) Distribution of toxins in various tissues of crucian carp intraperitoneally injected with hepatotoxic microcystins. *Environ Toxicol Chem* 27:1167–1174
- Li L, Xie P, Chen J (2007a) Biochemical and ultrastructural changes of the liver and kidney of the phytoplanktivorous silver carp feeding naturally on toxic *Microcystis* blooms in Taihu Lake, China. *Toxicon* 49:1042–1053
- Li L, Xie P, Li S, Qiu T, Guo L (2007b) Sequential ultrastructural and biochemical changes induced in vivo by the hepatotoxic microcystins in liver of the phytoplanktivorous silver carp *Hypophthalmichthys molitrix*. *Comp Biochem Phys C* 146:357–367
- MacKintosh C, Beattie KA, Klumpp S, Cohen P, Codd GA (1990) Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. *FEBS Lett* 264:187–192
- Malbrouck C, Kestemont P (2006) Effects of microcystins on fish. *Environ Toxicol Chem* 25:72–86
- Malbrouck C, Trausch G, Devos P, Kestemont P (2003) Hepatic accumulation and effects of microcystin-LR on juvenile goldfish *Carassius auratus* L. *Comp Biochem Phys C* 135:39–48
- Martins J, Vasconcelos V (2009) Microcystin dynamics in aquatic organisms. *J Toxicol Environ Health B* 12:65–82
- Mehner T, Busch S, Helland IP, Emmrich M, Freyhof J (2010) Temperature-related nocturnal vertical segregation of coexisting coregonids. *Ecol Freshw Fish* 19:408–419
- Metcalf JS, Beattie KA, Pflugmacher S, Codd GA (2000) Immunoreactivity and toxicity assessment of conjugation products of the cyanobacterial toxin, microcystin-LR. *FEMS Microbiol Lett* 189:155–158
- Oliveira R, Domingues I, Koppe Grisolia C, Soares AMVM (2009) Effects of triclosan on zebrafish early-life stages and adults. *Environ Sci Pollut R* 16:679–688
- Paerl HW, Huisman J (2008) Blooms like it hot. *Science* 320:57–58
- Pflugmacher S (2002) Possible allelopathic effects of cyanotoxins, with reference to microcystin-LR, in aquatic ecosystems. *Environ Toxicol* 17:407–413
- Pflugmacher S, Wiegand C, Oberemm A, Beattie KA, Krause E, Codd GA, Steinberg CEW (1998) Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: the first step of detoxication. *BBA-Gen Subj* 1425:527–533
- Prieto AI, Jos A, Pichardo S, Moreno I, Camean AM (2006) Differential oxidative stress responses to microcystins LR and RR in intraperitoneally exposed tilapia fish (*Oreochromis* sp.). *Aquat Toxicol* 77:314–321
- Smith JL, Haney JF (2006) Foodweb transfer, accumulation, and depuration of microcystins, a cyanobacterial toxin, in pumpkinseed sunfish (*Lepomis gibbosus*). *Toxicon* 48:580–589
- Sotton B, Anneville O, Cadel-Six S, Domaizon I, Kryš S, Guillard J (2011) Spatial match between *Planktothrix rubescens* and whitefish in a mesotrophic peri-alpine lake: evidence of toxins accumulation. *Harmful Algae* 10:749–758



## Effets de *P.rubescens* et des microcystines sur les populations de corégone (*C. lavaretus*)

### Short-term uptake of microcystin-LR by *Coregonus lavaretus*

---

- Tencalla FG, Dietrich DR, Schlatter C (1994) Toxicity of *Microcystis aeruginosa* peptide toxin to yearling rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat Toxicol* 30:215–224
- Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol* 13:57–149
- Welker M, Von Döhren H (2006) Cyanobacterial peptides—nature's own combinatorial biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev* 30: 530–563
- Williams DE, Craig M, Dawe SC, Kent ML, Andersen RJ, Holmes CFB (1997) <sup>14</sup>C-labelled microcystin-LR administered to Atlantic salmon via intraperitoneal injection provides in vivo evidence for covalent binding of microcystin-LR in salmon livers. *Toxicol* 35:985–989
- Wilson AE, Samelle O, Tillmanns AR (2006) Effects of cyanobacterial toxicity and morphology on the population growth of freshwater zooplankton: meta-analyses of laboratory experiments. *Limnol Oceanogr* 51:1915–1924
- Zegura B, Lah TT, Filipic M (2004) The role of reactive oxygen species in microcystin-LR-induced DNA damage. *Toxicology* 200:59–68
- Zegura B, Straser A, Filipic M (2011) Genotoxicity and potential carcinogenicity of cyanobacterial toxins—a review. *Mutat Res* 727:16–41

## 4 Effets de *P. rubescens* et des microcystines sur les juvéniles de perche (*Perca fluviatilis*)

### 4.1 Détermination expérimentale et *in-situ* des effets d'un bloom de *P. rubescens* et des microcystines sur les juvéniles de perche

#### 4.1.1 Contexte de l'étude

La perche (*Perca fluviatilis*) est une espèce piscicole particulièrement adaptée aux lacs mésotrophes mais qui est également présente en abondance dans des lacs à statuts trophiques très variables (Olin, 2002). Dans les lacs péri-alpins, les perches sont abondantes malgré le processus de ré-oligotrophisation qui tend à faire diminuer les stocks de percidés (Gerdeaux et al., 2006).

Au cours de leur cycle de vie, les perches réalisent des changements d'habitats et de ressources en fonction de leurs stades de développement (Wang et Eckmann, 1994; Guillard et al., 2006; Probst et Eckmann, 2009). Ainsi, après leur éclosion en zone littorale au printemps, les larves zooplanctonophages regagnent rapidement la zone pélagique où elles vont croître et former, pendant la journée, des bancs de juvéniles dans l'épilimnion (Guillard et al., 2006). Au cours de leur croissance, les populations de perches, littorales et pélagiques (Horppila et al., 2000) vont se nourrir successivement de macro-invertébrés puis au stade adulte de poissons principalement (Persson et al., 2000).

Dans le lac du Bourget, les juvéniles de perches sont observés à partir du mois de juin dans l'épilimnion où la température de l'eau varie entre 16 et 26 °C (Wang et Eckmann, 1994). Lors des blooms métalimniques de *P. rubescens*, les perches situées au dessus de la thermocline, généralement dans les 10 premiers mètres d'eau (Wang et Appenzeller, 1998), n'entrent donc potentiellement jamais en contact avec *P. rubescens* située dans le métalimnion entre 15 et 20 mètres de profondeur (Briand et al., 2005). Cette ségrégation physique de *P. rubescens* et des populations de perche pourrait donc limiter les possibilités de contact de ces poissons avec les MCs et donc les potentielles perturbations qui pourraient être causées lors de l'ingestion ou lors d'un contact avec de l'eau contenant des cyanotoxines. Cependant, à ce stade ontogénique les juvéniles de perche se nourrissent presque exclusivement de zooplancton et notamment de cladocères (Wang et Appenzeller, 1998;

Persson et al., 2000; Probst et Eckmann, 2009). Le zooplancton réalise au cours du cycle circadien des migrations verticales dans le but d'éviter notamment la forte pression de prédation exercée par les poissons dans l'épilimnion la journée (Hays, 2003). A l'aube, le zooplancton migre vers l'hypolimnion où la probabilité d'être détecté et mangé par les prédateurs est faible compte tenu des conditions d'éclairement, mais où la quantité de nourriture disponible est limitée. En revanche lors du crépuscule, le zooplancton migre vers l'épilimnion où la quantité de nourriture disponible est importante et où la pression de prédation est limitée au cours de la nuit (Masson et al., 2001; Hays, 2003). Ainsi, lors d'un bloom de *P. rubescens* dans le lac du Bourget, le zooplancton peut constituer une voie de contamination aux MCs pour les juvéniles de perches *via* les relations trophiques qui existent entre ces deux compartiments et malgré la ségrégation spatiale présente entre la cyanobactérie et les juvéniles de perches. Cette étude a donc comme objectifs de vérifier *in-situ* si la ségrégation spatiale entre les juvéniles de perche et la cyanobactérie est observable sur le lac du Bourget et ainsi d'évaluer si l'exposition des poissons aux MCs se fait uniquement *via* le zooplancton. En parallèle, les dynamiques d'accumulation et de détoxification des MCs seront étudiées par gavage des juvéniles de perche avec des concentrations en MCs qui peuvent être ingérées par les poissons *via* la consommation de zooplancton. Par ailleurs, des perturbations histologiques et des effets génotoxiques éventuels seront investigués afin de mieux comprendre et de mieux appréhender les effets potentiels de ces cyanotoxines sur les populations de perche issues du lac du Bourget.

#### 4.1.2 Résumé de l'étude

Au cours de l'été 2009, les bancs de perche présents dans l'épilimnion du lac du Bourget étaient spatialement séparés du bloom de *P. rubescens* présent dans le métalimnion et n'entraient donc jamais en contact direct avec la cyanobactérie. Toutefois, des concentrations en MCs dans les foies et les muscle des perches, suivant la même dynamique saisonnière que celle observée dans le seston composé majoritairement de filaments de *P. rubescens*, ont pu être mesurées. De plus, les daphnies qui se nourrissent essentiellement du seston, et qui constituent une part importante du régime alimentaire des juvéniles de perche au cours de la saison étaient riches en MCs. Ces résultats suggèrent qu'un transfert de MCs des cyanobactéries aux juvéniles de perche a eu lieu *via* la consommation de zooplancton et notamment de daphnies. En complément et afin d'aider à l'interprétation des observations de terrain, l'accumulation, l'activité de la GST ainsi que les effets histologiques et génotoxiques

de la MC-LR sur les juvéniles de perche ont été analysés expérimentalement après gavage des poissons avec deux concentrations en cyanotoxines écologiquement pertinentes. Les résultats expérimentaux montrent que la MC-LR s'accumule dans les foies et les muscles des juvéniles mais qu'elle semble également être détoxifiée et excrétée assez rapidement malgré aucun changement de l'activité GST au cours de l'expérience. Cette capacité de détoxification et d'excrétion pourrait expliquer les faibles différences de concentrations en MCs présentes dans les perches du lac du Bourget et les perches expérimentales malgré le contact chronique des juvéniles de perche du lac avec les MCs *via* la consommation de zooplancton. De plus, aucun effet histologique n'a pu être mis en évidence que ce soit dans les perches de lac ou dans les perches expérimentales. Cette observation indique que les concentrations en MCs présentes dans le lac du Bourget en 2009 étaient trop faibles pour induire des lésions histologiques suffisantes pour provoquer la mortalité des juvéniles de perches. En revanche, des dommages à l'ADN ont pu être observés expérimentalement pour les deux concentrations d'exposition. Ceci suggère que des effets similaires pourraient se produire dans le lac sur les juvéniles de perche et potentiellement entraîner des perturbations de la population durant les proliférations de cyanobactéries.

## 4.1.3 Article 3

OPEN ACCESS Freely available online

PLOS ONE

Impact of Toxic Cyanobacterial Blooms on Eurasian Perch (*Perca fluviatilis*): Experimental Study and *In Situ* Observations in a Peri-Alpine LakeBenoît Sotton<sup>1\*</sup>, Jean Guillard<sup>1</sup>, Sylvie Bony<sup>2,5</sup>, Alain Devaux<sup>2,5</sup>, Isabelle Domaizon<sup>1</sup>, Nicolas Givaudan<sup>1,3</sup>, François Crespeau<sup>4</sup>, Hélène Huet<sup>4</sup>, Orlane Anneville<sup>1</sup><sup>1</sup> INRA, UMR CARRTEL, Thonon Les Bains, France, <sup>2</sup> Université de Lyon, LEHNA, UMR 5023, ENTPE, Vaulx en Velin, France, <sup>3</sup> UMR CNRS Ecobio 6553, Université de Rennes 1, Campus de Beaulieu, Rennes, France, <sup>4</sup> Laboratoire d'Anatomie Pathologique, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort, France, <sup>5</sup> INRA, USC IGH, ENTPE, Vaulx en Velin, France

## Abstract

Due to the importance of young-of-the-year (YOY) perch in the peri-alpine regions where they are consumed, the microcystin (MC) contamination of YOY perch was analysed both in field (Lake Bourget, France) and experimentally using force-feeding protocols with pure MCs. *In-situ*, schools of YOY perch present in the epilimnion of the lake were never found in direct contact with the *P. rubescens* blooms that were present in the metalimnion. However, MCs were detected in the muscles and liver of the fish and were thus assumed to reach YOY perch through dietary routes, particularly via the consumption of MC-containing *Daphnia*. Force-feeding experiment demonstrates the existence of MC detoxification/excretion processes and suggests that *in situ*, YOY perch could partly detoxify and excrete ingested MCs, thereby limiting the potential negative effects on perch populations under bloom conditions. However, because of chronic exposure these processes could not allow for the complete elimination of MCs. In both experimental and *in situ* studies, no histological change was observed in YOY perch, indicating that MC concentrations that occurred in Lake Bourget in 2009 were too low to cause histological damage prone to induce mortality. However, Deoxyribonucleic acid (DNA) damages were observed for both the high and low experimental MC doses, suggesting that similar effects could occur *in situ* and potentially result in perch population disturbance during cyanobacterial blooms. Our results indicate the presence of MCs in wild perch, the consumption of this species coming from Lake Bourget is not contested but more analyses are needed to quantify the risk.

**Citation:** Sotton B, Guillard J, Bony S, Devaux A, Domaizon I, et al. (2012) Impact of Toxic Cyanobacterial Blooms on Eurasian Perch (*Perca fluviatilis*): Experimental Study and *In Situ* Observations in a Peri-Alpine Lake. PLoS ONE 7(12): e52243. doi:10.1371/journal.pone.0052243

**Editor:** Sandra Maria Feliciano de Oliveira Azevedo, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil

**Received:** July 27, 2012; **Accepted:** November 15, 2012; **Published:** December 18, 2012

**Copyright:** © 2012 Sotton et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** B.S.'s PhD is a CIBLÉ project funded by the Rhône-Alpes region. N.G.'s CDD and experiments were financed by ONEMA (Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques). The *in-situ* sampling and data analyses were part of "Projet innovant" funded by the department "Ecologie des forêts, Prairies et milieux Aquatiques" (EPPA) of the "Institut National de la Recherche agronomique" (INRA). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: benoit.sotton@thonon.inra.fr

## Introduction

During the past century, toxic cyanobacterial blooms have appeared worldwide as a result of the eutrophication of freshwater ecosystems. Toxic cyanobacteria produce a wide variety of metabolic compounds that are toxic for many aquatic organisms and humans [1–3]. In the aquatic sciences, the most studied toxic compounds produced by cyanobacteria are the microcystins (MCs), of which more than 80 variants have been characterised [4–5]. MCs are known to inhibit protein phosphatases 1 and 2A (PP1 and PP2A) by an initial non-covalent and reversible binding followed by a final covalent and irreversible linkage step [6] and thereby cause oxidative stress, apoptosis and the disruption of many cellular functions. MCs may act as tumour promoters and as genotoxins, as shown recently in whitefish [7]. Deleterious effects of MCs on the physiology and behaviour of various fish species have been observed [8,9]. Histological disturbances, particularly in the liver, kidney, gills and intestine, have been observed in fish exposed to cyanobacteria and their toxins [10–12].

A large array of xenobiotics is known to be metabolised by fish detoxification systems [13]. The detoxification process involves a variety of enzymes that are implicated in the oxidation, reduction, hydrolysis and conjugation of xenobiotics present in organisms. The most studied detoxification enzymes in fish are the glutathione S-transferases (GSTs) that are responsible for the conjugation of MCs with glutathione (GSH) prior to biliary excretion [7,14]. Experimental studies on the detoxification of MCs in various fish species have shown that this "natural defence" is species-specific and that the concentrations of MCs in fish are dose dependent [15]. Fish chronically assimilate MCs by the ingestion of cyanobacteria and contaminated zooplankton and the flow of water through their gills, leading generally to the gradual accumulation of toxins in organs [16]. However, exposure to MCs may or may not result in MC accumulation depending on the dynamics and intensity of the MCs intake and detoxification process. The measurement of MC levels in fish sampled *in situ* is essential, and the interpretation of MC concentration requires a good understanding of the dynamics of detoxification for the particular fish species being studied. The histological and genetic

impacts of low toxin concentrations are difficult to evaluate in the field, primarily because of the lack of a reference state. Experimental data are therefore needed to facilitate the interpretation of field observations and to accurately assess the potential impact of MCs on fish species. For these reasons, we combined field and experimental approaches to better estimate the transfer of toxins to natural fish populations and to evaluate the potential impact of toxins on individual fish. We studied perch (*Perca fluviatilis*), a target fish species in recreational and commercial fisheries in peri-alpine lakes that has been commercialised in both its adult and young-of-the-year (YOY) stages.

In Lake Bourget (France), toxic blooms of the cyanobacterium *Planktothrix rubescens* occur [17] and produce primarily two MC variants termed MC-LR and MC-RR [18–20]. We used an ecosystemic approach to study *in situ* the exposure of a YOY perch population to *P. rubescens* by (i) identifying the main routes of fish exposure to MCs, (ii) assessing toxin accumulation in the fish during chronic exposure to a cyanobacterial bloom and (iii) evaluating the subsequent histological effects in the fish. Parallel experimental studies using environmentally relevant doses of MC-LR were performed in the laboratory to (i) characterise the temporal dynamics of intoxication and detoxification and (ii) assess the histological and genotoxic impacts in YOY perch exposed to environmentally relevant doses of MC-LR.

## Materials and Methods

### Ethical statement

Investigations were conducted according to the international guiding principles for the use and care of laboratory animals, and in compliance with French regulations (N° B 74 300-4) on animal welfare approved by the French Ministry of Ecology and Sustainable Development. This study was approved by the ethic committee of the Departmental Direction of Veterinary Services of Haute-Savoie (DDSV). *In-situ* sampling was made on public area with a sampling authorisation (N° 2012 209) delivered by the Prefecture of Savoie and did not involve protected species.

*In-situ* fish were captured by pelagic trawl and quickly killed, as experimental fish, by a cranial choc.

### Study site

Lake Bourget (45°44'N, 5°52'E, 231 m altitude) is a mesotrophic, warm, monomictic lake located in eastern France. It has an area of 42 km<sup>2</sup>, a total volume of 3.5 × 10<sup>9</sup> m<sup>3</sup> and maximum and average depths of 145 and 80 m, respectively [19]. Its water is used as a source of drinking water and for recreational activities and fisheries. The cyanobacterium *P. rubescens* was first reported in the lake in the 1950 s [21]. The occurrence and intensity of its blooms have been precisely studied since the 1990 s [17]. *P. rubescens* is present in the metalimnion of the lake during the summer [22].

### In situ sampling

Six daily east-west transects were performed in the northern part of the lake twice a month in August and September 2009 and once in October 2009. Three points were sampled for each transect. A fluoroprobe (BBE, Moldaenke, Germany) specially calibrated to estimate *P. rubescens* biomass was used at each sampling point [23] and the thermocline depth was followed in parallel. At each sampling point, 2 L water samples were taken at three depths (6 m, 12 m and the depth of *P. rubescens* maximum density) for MC analysis. The water samples were passed through a filter (pore size 1 µm, Nucleopore, Whatman) and stored at −20°C until analysis.

The schooling of perch during the day [24,25] and their position in the water column were studied using hydroacoustic methods [26] as described previously [27].

The intake of cyanobacterial toxins may result from the consumption of intoxicated prey [16,28]. Prey items were identified by stomach content analysis. For this purpose, perch were sampled at night using a pelagic trawl [29] and stocked at 4°C until laboratory analysis. On the date of maximal concentrations of *P. rubescens* (27 August), zooplankton were sampled by several vertical tows at depths of 0 to 50 m with a 200 µm-mesh conical net and kept alive in cooler boxes until sorting through air bubbling techniques [30]. Then, Cladocerans were picked up on the surface of the water bubbled and immediately deep-frozen in liquid nitrogen until laboratory analysis.

### Zooplankton and fish sample preparation

In laboratory, Cladocerans samples were defrosted and *Daphnia* were then sorted out under a binocular microscope, thoroughly rinsed with ultrapure water to remove all attached *P. rubescens* filaments and then extracted for MCs analyses.

YOY perch were weighed, measured and dissected. Individual gut contents were observed under a microscope (magnification 40X). Ingested prey items were identified and counted at the genus level. Dorsal muscle and liver were sampled for each fish (n = 27) and preserved in formalin for histological studies. For MC analysis at each sampling date, the individual organ samples were pooled to provide 3 liver samples and 3 muscle samples.

### Laboratory experimental design

Experiments were performed in triplicate using YOY perch raised from eggs collected in Lake Geneva (France/Switzerland) and reared in tanks (research unit AFPA, Nancy University, France).

The perch were acclimatised for 1 week prior to experiments in outdoor tanks (480 L) supplied with water from Lake Geneva that was free from toxic cyanobacteria and was pumped continuously from a depth of 36 m. For each replicate, 440 fish (mean weight 3.36 ± 0.24 g) were starved for 24 hours prior to treatment and were then distributed in cylindrical 20-L cages (n = 22 fish per cage) that were placed in clean large tanks (1140 L) filled with lake water at 20°C. The fish were anaesthetised in water containing 300 µL propiscin per L (0.2%). For each replicate, 110 fish were individually force-fed through a catheter connected to a Hamilton syringe with 10 µL of a 5 mg.L<sup>−1</sup> MC-LR solution (i.e., approximately 0.05 µg MC-LR per fish) or with 10 µL of a 50 mg.L<sup>−1</sup> MC-LR solution (i.e., approximately 0.5 µg MC-LR per fish). MC-LR (Gentaure Corporation, France) was dissolved in water containing 0.04% phenol red to ensure that the force-feeding was successful. The MC concentrations of the force-fed solutions were confirmed by HPLC-PDA. The chromatographic resolution of MC-LR was achieved using the following mixture of MilliQ-water 0.3% (v/v) trifluoroacetic acid (A) and acetonitrile (B) as the mobile phase, in an elution gradient run on a chromatographic system (Waters) equipped with Waters 600 pump controller, a PDA 996 photodiode-array detector, a C18 PHENOMENEX Luna 5 mm (4.6 mm × 250 mm) column and Waters 3.2 millennium chromatography manager software. The flow rate was 1 ml/min and MC-LR peak was identified on the basis of their characteristic absorption spectra (maximum absorption at 238 nm) and its retention time [27]. As a placebo treatment, 110 fish were force-fed with 10 µL of a 0.04% neutral solution of phenol red to evaluate the effect of phenol red on the measured endpoints. The control treatment consisted of 110 fish that were not force-fed. During each experiment, the fish were not



fed and were maintained at a water temperature of 20°C, a dissolved oxygen concentration of  $11.7 \pm 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , a pH of  $8.1 \pm 0.3$  and a natural light/dark cycle of 16/8 h.

At 6, 12, 24, 48 and 96 h after the start of each experiment, 10 fish per treatment were killed, weighed, measured and dissected. Muscle tissues were sampled, pooled and stored at  $-80^\circ\text{C}$  until analysis. A liver sample from each fish was divided into two equal parts to provide two pools (one for MC analysis and another for the measurement of enzyme activity) and stored at  $-80^\circ\text{C}$  until analysis. For each treatment, blood from the caudal vein was collected in a heparinised syringe. The blood samples were diluted 100-fold in a cryopreservative buffer (250 mM sucrose, 40 mM trisodium citrate, 5% dimethyl sulfoxide (DMSO) adjusted to pH 7.6 with 1 M citric acid), deep-frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^\circ\text{C}$  processing. For histological analysis, 2 fish per treatment were dissected and liver and intestine samples were fixed immediately in formalin solution.

Environmentally relevant concentrations of 0.05 and 0.5  $\mu\text{g}$  MC per fish (corresponding to 16.6 and 166  $\mu\text{g}/\text{kg}$  body weight, respectively) were chosen for the experiments based on our previous observation that MC concentrations in zooplankton in Lake Bourget range from 0.07 to 3.5  $\mu\text{g}/\text{g}$  dry weight (DW) when *P. rubescens* is present (unpublished data). We found that MC concentrations in cladocerans under experimental conditions reached 1.1  $\mu\text{g}/\text{g}$  fresh weight (FW) for organisms fed with cyanobacteria concentrations equivalent to those measured during the summer blooms in Lake Bourget (unpublished data). Karås and Thoreson [31] reported a maximum daily food consumption of approximately 15% of fresh body weight for YOY perch. We therefore estimate that fish weighing approximately 3 g could ingest, *via* zooplankton, 0.05  $\mu\text{g}$  MCs per day at the beginning of the bloom and 0.5  $\mu\text{g}$  MCs per day at the height of the bloom.

#### MC extraction and analysis

For MC analysis of *P. rubescens*, the extraction and measurement procedures described by Sotton et al. [27] were used. Zooplankton and YOY perch samples were ground, homogenised in 100% methanol, sonicated in an ultrasonic bath (Elma Sonic) for 5 min and then centrifuged (Beckman AVANTI J30 I) (24000 g, 45 min,  $-5^\circ\text{C}$ ) to precipitate the co-extracted proteins [32]. This extraction procedure was repeated twice. The supernatants from each extraction were collected with a 5-mL syringe and washed with hexane. The methanol layers were filtered through a syringe filter (pore size 0.2  $\mu\text{m}$ ; PTFE, Whatman), pooled and evaporated to dryness at  $40^\circ\text{C}$  with a SpeedVac device (SpeedVac Plus SC110A, Savant). Each dry extract was dissolved in an adequate volume of Milli-Q water; this volume varied depending on the sample. ELISA analyses were performed using a Microcystins (Adda-specific) Plate Kit (Abraxis LLC) [33,34] and absorbances at a wavelength of 450 nm were determined using a microplate reader (Dynex MRX II, Dynex Technologies, Inc., USA). The results are presented as ng MC-LR equivalents per g fresh weight (FW). This method for the quantification of free MC concentrations was chosen because of its sensitivity and specificity. However, the method does not allow the discrimination of pure MC-LR from its metabolites and may have led to the overestimation of pure MC-LR concentrations in our samples [35,36].

#### GST activity measurement

Liver samples from experimental YOY perch were homogenised in cold phosphate buffered saline (PBS) and centrifuged at  $10000 \times g$  for 15 min at  $4^\circ\text{C}$ . The supernatant was collected, and protein content was measured by spectrophotometry at 595 nm (Varian Cary 50 Spectrophotometer, Agilent Technologies, USA)

according to the method of Bradford (1976). GST activity was determined by fluorometry using a GST Fluorometric Assay Kit (Biovision, USA) and a microplate reader (Fluoroskan Ascent FL, Thermo Fisher Scientific, France) at excitation wavelength 380 nm and emission wavelength 460 nm. The results are reported as U per mg total protein content, where U equals the quantity of enzyme that catalyses the transformation of 1  $\mu\text{mol}$  substrate per minute.

#### DNA damage assessment

DNA damage was measured in erythrocytes by the alkaline Comet assay using a slight modification of the procedure of Singh et al. [37]. The blood cells were thawed rapidly just before the assay, the cell density was adjusted to  $10^3 \text{ cells} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  cold PBS, and the cell viability was checked by the trypan blue exclusion method [38]. The cell viability was found to be  $>90\%$  in all experiments. Microscope slides were immersed in melted normal agarose prepared in PBS (final concentration 0.8%) and dried overnight at room temperature. A 50- $\mu\text{L}$  aliquot of 1% low melting point agarose in PBS mixed with an equal volume of cell suspension was spread on the slide and a coverslip was placed. The agarose was solidified on an ice-chilled plate, a second layer consisting of 90  $\mu\text{L}$  of 0.5% low melting point agarose was spread on the first layer, a coverslip was placed, and the agarose was again solidified by chilling. The subsequent steps were performed under a dim red light to avoid artificial DNA damage. The cells were treated with a lysing solution (2.5 M NaCl, 0.1 M EDTA, 10 mM Tris, pH 10, 1% (v/v) Triton X-100) and 10% (v/v) DMSO for 1 h at  $4^\circ\text{C}$ , and the DNA was allowed to unwind for 40 min in an electrophoresis buffer (0.3 M NaOH, 1 mM EDTA, pH  $>13$ ). Electrophoresis was run for 24 min at 20V and 300 mA (0.6 V/cm). The slides were neutralised by Tris buffer (0.4 M Tris, pH 7.5) and dried for 15 min in absolute ethanol. The DNA was stained with 0.05 mM ethidium bromide and scored using an Axioskop epifluorescence microscope (Zeiss, Germany) and the Comet assay IV image analysis system (Perceptive Instruments Ltd., UK). Randomly selected cells from two replicate slides (50 cells per slide) were analysed. Of the Comet parameters, the tail intensity (percentage of tail DNA) is the most relevant [39]. Comet figures that showed an extremely prominent tail and that lacked a clearly identifiable head were excluded from the analysis because such figures may originate from necrotic or apoptotic processes [40].

#### Histopathological analysis

Liver and intestine samples were fixed in buffered 10% formaldehyde solution for 48 hours, placed in a 70% ethanol solution, dehydrated in successive ethanol baths, embedded into blocks of paraffin wax and cut into 3.5- $\mu\text{m}$  sections. The slides were rehydrated in successive 100% and 95% ethanol baths and stained with hematoxylin-eosin-saffron (HES) by a standard procedure. Periodic acid-Schiff (PAS) staining was performed to reveal the glycogen content of liver cells. Staining was performed according to standard histological procedures [41].

#### Statistical analysis

Comparisons of fish survival rates between treatments at each sampling time were performed using the nonparametric Mann-Whitney test at  $p < 0.05$ . MC-LR accumulations at different sampling times were compared in liver and muscle and for each dose using the nonparametric Kruskal-Wallis test followed by multiple pairwise comparisons using the Conover-Iman procedure. Comparisons of MC-LR accumulations between treatments at each sampling time were also performed using the nonparametric Mann-Whitney test. Differences were considered significant

at the  $p < 0.05$  level for all statistical analyses. Comparisons of GST activity between treatments at each sampling time were performed using the nonparametric Mann-Whitney test at  $p < 0.05$ . Because the distribution of DNA damage measured by the Comet assay does not follow a Gaussian distribution, both the nonparametric Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests were used for data analysis. All statistical analyses were performed using the XLSTAT 2011 software program.

## Results

### In situ observations

The YOY perch preyed on various zooplankton taxa during the study period. Their diet consisted mainly of *Daphnia* and *Leptodora*. Copepods and other herbivorous cladocerans (*Bosmina*, *Diaphanosoma*) were also present in the stomach contents but had a lower abundance and frequency. *Bythotrephes* and rotifers were found occasionally and had low abundance (Fig. 1).

The relative abundance of these prey taxa fluctuated during the summer. At the beginning of August, *Daphnia* was the dominant taxon and comprised 80% of the YOY diet (Fig. 2); this percentage declined steadily until it reached a low value of 10%. Meanwhile, the percentage of *Leptodora* in the diet increased steadily and reached a maximum of 75% in September. The diet was dominated by herbivorous taxa in August but by carnivorous taxa in September.

The YOY perch were located exclusively in the epilimnion during the entire sampling season. At this depth, the MC concentration remained  $\leq 0.12 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Fig. 3). The highest MC concentrations were found between 15 and 20 m, which was the depth of maximal *P. rubescens* abundance as detected by the BBE probe. During the summer, the maximal MC concentrations were found below the thermocline. At the depth of maximal *P. rubescens* abundance, MC concentrations were highest in August, with average concentrations that ranged from  $2.3$  to  $3.4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Fig. 3).

Although no spatial correlation between perch and *P. rubescens* abundance was observed, MC was detected in perch liver and muscle samples from August to October. The maximal MC concentrations ( $34 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$  FW in liver;  $14 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$  FW in muscle) were detected on the date (27 August 2009) that the maximal sestonic MC-LR equivalent concentrations were measured in the water column. Subsequently, a significant ( $p < 0.05$ ) decrease in MC concentration was observed in both organs. Significant positive correlations were observed between the MC concentration

in seston and those in liver ( $R^2 = 0.7221$ ) and in muscle ( $R^2 = 0.6369$ ) samples from YOY perch. Regardless of the date, MC concentrations were higher in liver than in muscle (Fig. 4). On the 27 August, when the MC concentrations in *P. rubescens* and seston in the water column were maximal (Fig. 4), the MC-LR equivalent concentration in *Daphnia* was  $422 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$  FW.

No histological alterations were observed for any sampling date or any of the organs studied.

### Experimental study

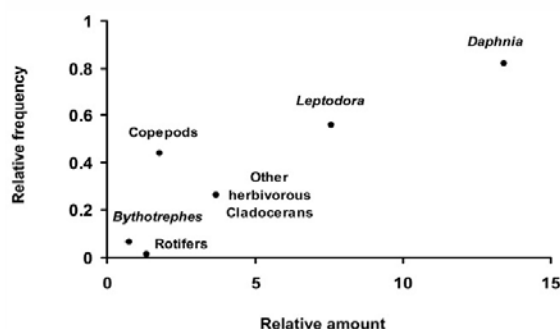
**Microcystin accumulation.** The mortality rate never exceeded 10% in the experimental groups. There were no significant differences in mortality between treatments regardless of the sampling time (data not shown).

Regardless of the experimental MC concentration or the sampling time, no MC was detected in either the control or placebo groups. For both of the MC-LR treatments, the toxin was detected in the liver and muscle samples of perch from the first sampling time (6 h) until the end of the experiment (Figs. 5 and 6). At 6 h, the MC concentrations detected in both organs were dose-dependent, and the concentrations in the liver were higher than those in muscle. In the liver, for the higher experimental MC-LR dose, a significant increase ( $p < 0.05$ ) in MC-LR concentration was detected at 12 h. The concentration was  $37 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$  FW at 12 h and then fell rapidly to reach a significantly ( $p < 0.05$ ) lower value at 24 h (Fig. 5). In the liver, for the lower experimental MC-LR dose, the MC-LR concentration was significantly ( $p < 0.05$ ) lower at 12 h, increased gradually until 48 h when it reached its maximal value and then declined to reach a significantly ( $p < 0.05$ ) lower value at 96 h (Fig. 5). In the muscle, significant increases in toxin concentration were observed for all experimental MC-LR doses (Fig. 6). At the end of the experiment, the MC-LR concentration was approximately  $7 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$  FW for the higher experimental dose and  $4 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$  FW for the lower experimental dose (Fig. 6).

**GST activity.** Regardless of the sampling time, no significant difference in GST activity was found in the control vs. placebo groups or in the control vs. experimental groups (Fig. 7). There was high variability among the replicates.

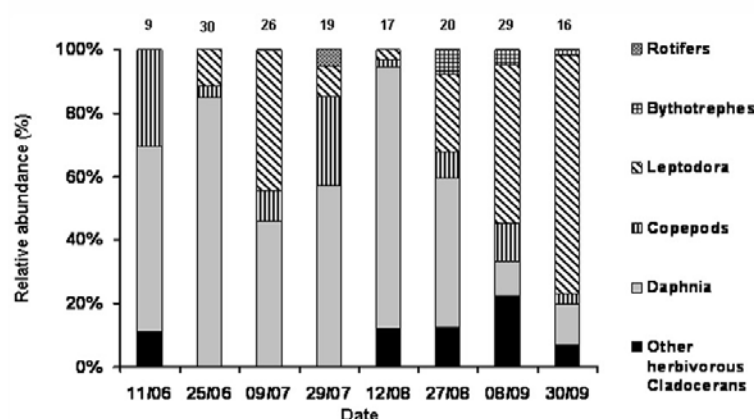
**Histology.** Regardless of the sampling time or the organ studied (liver vs. intestine), no significant histological differences were observed among the placebo, control and experimental groups (treated with 0.5 or  $0.05 \mu\text{g}$  MC-LR/fish) (Fig. 8). Regardless of the sampling time, PAS staining did not reveal any differences in glycogen storage or consumption in the livers of the control vs. experimental groups (Fig. 9).

**DNA damage.** Significant DNA damage, expressed as % tail intensity, was observed in the erythrocytes of the experimental group (Fig. 10). Basal DNA damage in the placebo and control groups remained in the range of 3 to 20% tail intensity throughout the study. A 3-fold increase in DNA damage was observed 12 hours after the initial force-feeding for the higher MC-LR dose. A clear trend of decreasing DNA damage with time was observed in the group treated with  $0.5 \mu\text{g}$  MC-LR, although DNA damage after 48 h was still significantly greater in comparison with the control group. The induction of DNA damage in the group that received the lower MC-LR dose was delayed relative to the group that received the higher dose in that the damage was significantly increased (5-fold) in comparison with the control group only after 48 h. Regardless of the MC-LR dose, none of the experimental groups displayed evidence of genotoxicity greater than that of the control group after 96 h.



**Figure 1. Average prey preference of YOY perch during the studied period.** Average prey specific abundance observed in the stomach content (X axis) plotted against the average frequency of occurrence of the prey in the diet (Y axis). doi:10.1371/journal.pone.0052243.g001



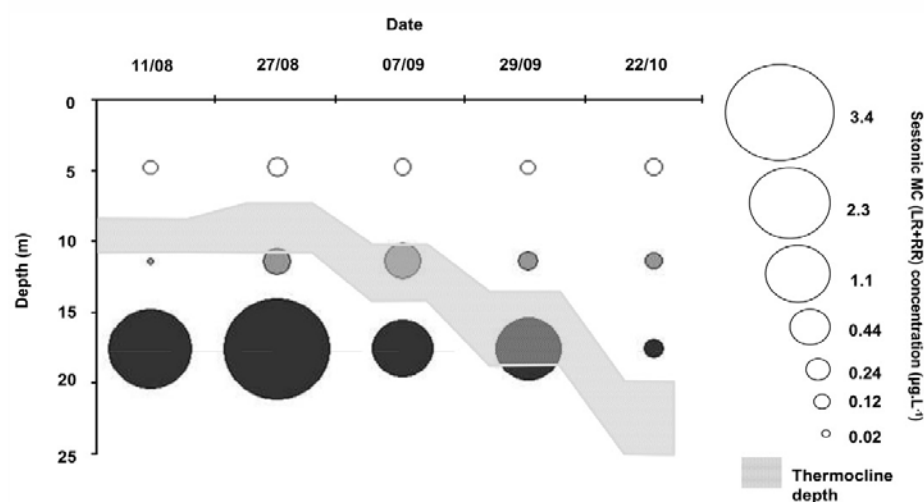


**Figure 2. Temporal changes of the relative abundance of the zooplankton prey taxa observed in stomach contents.** The number of analysed stomach contents is indicated above the bars.  
doi:10.1371/journal.pone.0052243.g002

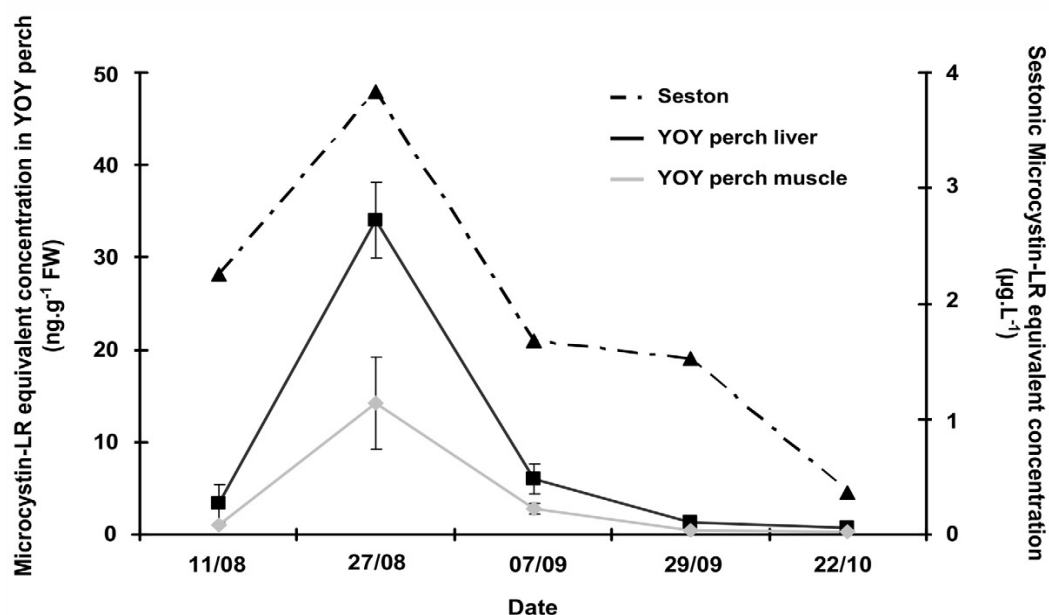
## Discussion

Two points regarding the MC concentrations measured in our study must be discussed. Firstly, only free MCs were measured. MCs undergo a two-step interaction with phosphatase proteins 1 and 2A [42]: (i) a rapid and reversible binding with the phosphatases and (ii) a covalent linkage between the N-methyldehydroalanine residue (Mdha) of the MCs and a nucleophilic site on the phosphatases, leading to irreversible inactivation [43,44]. To measure the total MC concentration, the free and the covalently bound MCs must be extracted from the sample by two different methods [45]. It has been estimated that 38–99% of MCs [28,46,47] may be covalently linked to phosphatases and thereby unextractable by the organic solvents that are used for free MCs. The measurement of only free MCs may therefore lead to an underestimation of total MC concentra-

tions in samples. Secondly, the free MC concentrations measured in liver and muscle samples from YOY perch are most likely greater than the real concentrations of pure free MC-LR that are present in these two organs. Our ELISA method, which targets molecules that possess an unusual  $\beta$ -amino acid (ADDA; 4*E*, 6*E* 3-amino-9-methoxy-2, 6, 8-trimethyl-10-phenyldeca-4, 6-dienoic acid), quantifies all molecules that possess ADDA as pure MCs but also so quantifies the detoxification products of MCs, which are less toxic [35]. Our method may therefore lead to an overestimation of free MC levels in YOY perch; i.e., the toxin values presented here may underestimate the total MC concentrations in samples as a result of the extraction method that targets only free MCs while the pure MC-LR concentrations of samples may be overestimated as a result of the ELISA measurements that quantify both pure MCs and their metabolites.



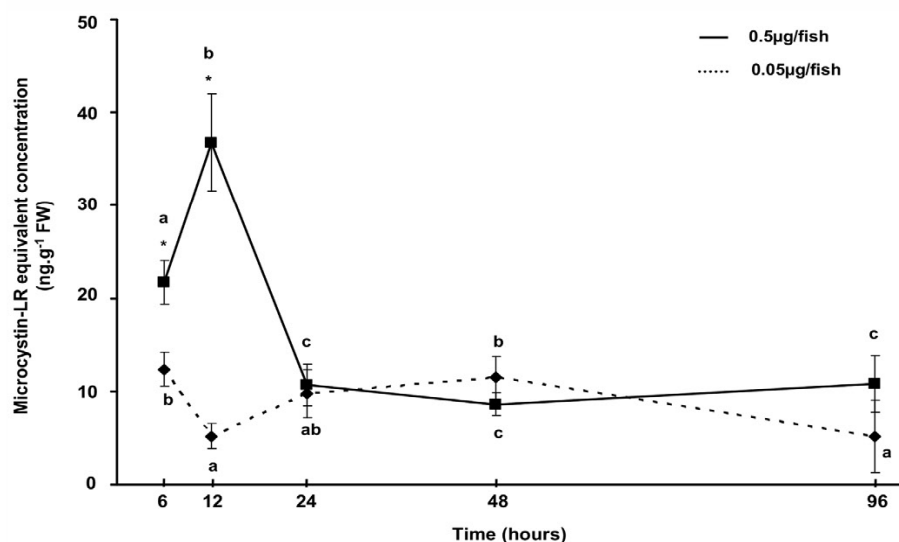
**Figure 3. Sestonic microcystin (LR+RR) concentrations at 6 m (white), 12 m (grey) and at the *P. rubescens* peak depth (black) in Lake Bourget during summer 2009.** To facilitate the figure reading, the mean of peak depths was calculated for each date.  
doi:10.1371/journal.pone.0052243.g003



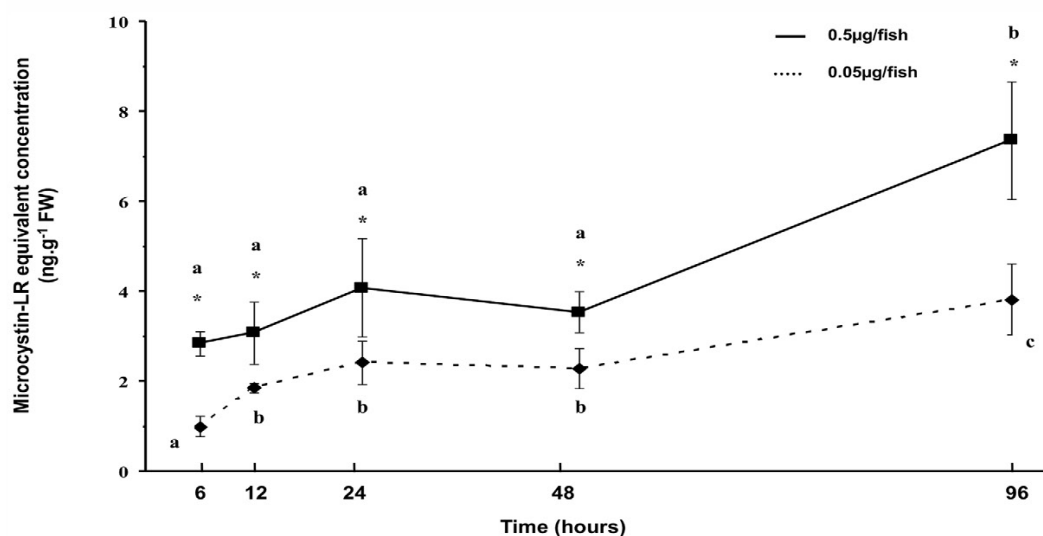
**Figure 4. Microcystin concentrations in liver and muscle of YOY perch and in seston during summer 2009 in Lake Bourget.** Sestonic MC-LR equivalent concentrations are expressed as  $\mu\text{g.L}^{-1}$  and correspond to the sum of average concentrations found at the three depths sampled (6 m, 12 m, *P. rubescens* peak depth). MC-LR equivalent concentrations measured in organs are expressed as  $\text{ng.g}^{-1}$  fresh weight. doi:10.1371/journal.pone.0052243.g004

Previous studies have revealed differences between fish species in terms of their sensitivity to cyanobacterial toxins [15]. The number of feeding experiments on fish using MCs or cyanobac-

teria has greatly increased in recent years. However, few studies have focused on fish species endemic to the peri-alpine lakes in which *P. rubescens* blooms have occurred repeatedly during the past



**Figure 5. MC-LR accumulation in liver of YOY perch exposed to two relevant doses, 0.5  $\mu\text{g}/\text{fish}$  and 0.05  $\mu\text{g}/\text{fish}$ .** \* corresponds to a significant difference observed between microcystin treatments (Mann-Whitney,  $p < 0.05$ ). MC-LR equivalent concentrations are expressed as  $\text{ng.g}^{-1}$  fresh weight. Different letters correspond to a significant difference between sampling times (Mann-Whitney,  $p < 0.05$ ). doi:10.1371/journal.pone.0052243.g005

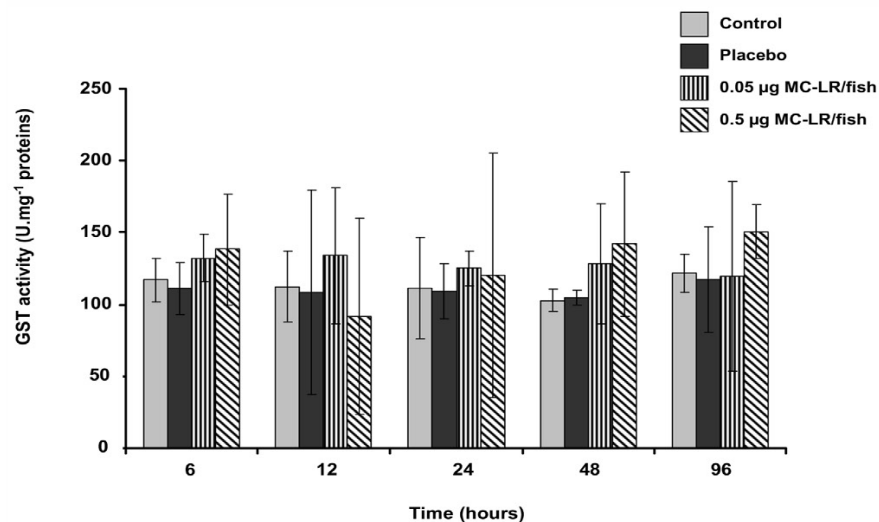


**Figure 6. MC-LR accumulation in muscle of YOY perch exposed to two relevant doses, 0.5 µg/fish and 0.05 µg/fish.** \* corresponds to a significant difference observed between microcystin treatments (Mann-Whitney,  $p < 0.05$ ). MC-LR equivalent concentrations are expressed as  $\text{ng.g}^{-1}$  fresh weight. Different letters correspond to a significant difference between sampling times (Mann-Whitney,  $p < 0.05$ ). doi:10.1371/journal.pone.0052243.g006

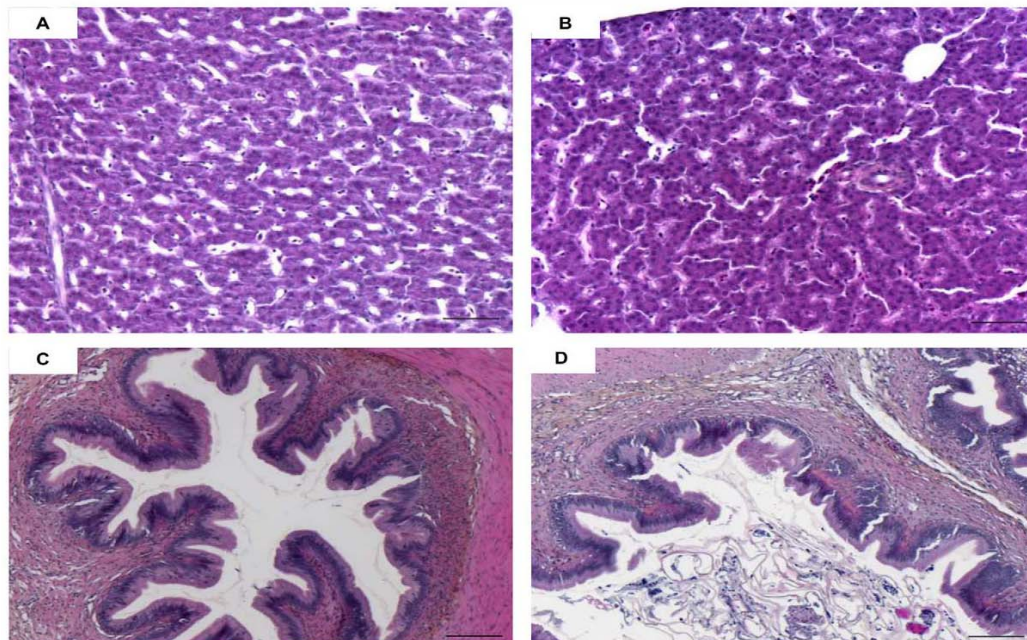
10 years [17,48,49]. In particular, there have been no studies on the Eurasian perch, which is important both commercially and for sport fishing, is widespread throughout Europe and Asia and has been successfully introduced in other continents.

The mortality rates for YOY perch observed following force-feeding with environmentally relevant MC concentrations was low

in the present study. Fish weighing 3 g were treated with 0.5 µg and 0.05 µg of MC-LR per fish; these doses correspond to approximately 166 µg/kg and 16.6 µg/kg body weight, respectively. The MC-LR concentrations used were well below the median lethal concentration values ( $\text{LC}_{50}$ ) obtained after injection of 550 µg MC-LR/kg body weight for common carp (*Cyprinus*



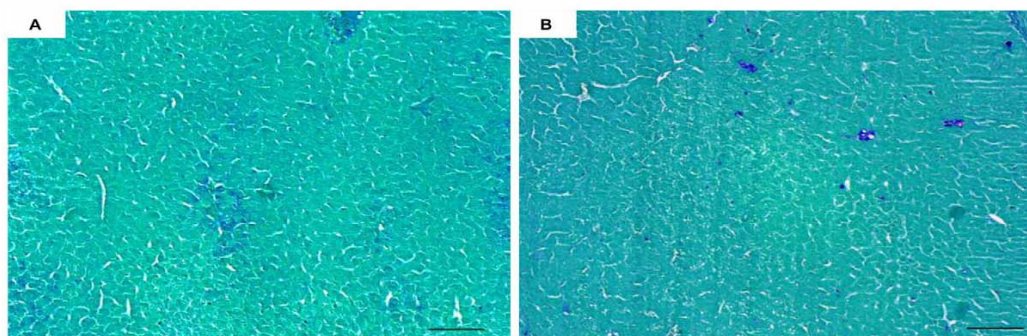
**Figure 7. Glutathione S-transferase (GST) activity in liver of YOY perch force-fed with two doses of MC-LR (0.05 µg and 0.5 µg/fish).** GST activity is expressed as  $\text{U.mg}^{-1}$  proteins. doi:10.1371/journal.pone.0052243.g007



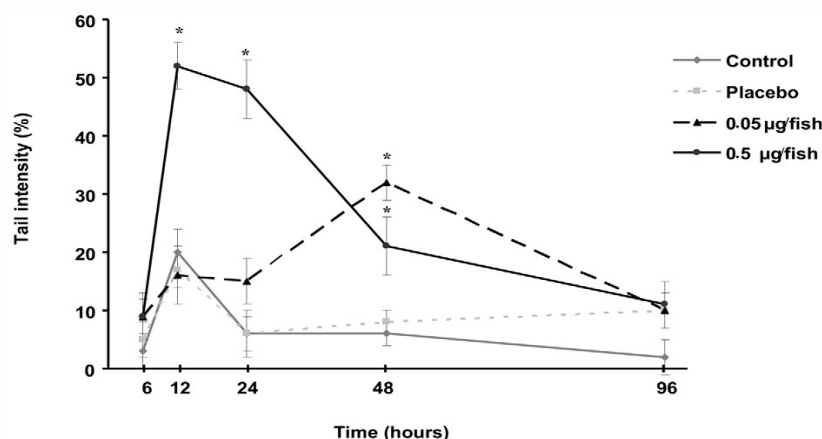
**Figure 8. Light microscopy transverse sections of liver (A–B) and intestine (C–D) of control (A–C) and treated (0.5 µg of MC-LR) (B–D) YOY perch, stained with hematoxylin-eosin-saffron.** Scale bar: 50 µm for liver and 100 µm for intestine.  
doi:10.1371/journal.pone.0052243.g008

*carpio*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [50,51]. This fact may explain the low mortality rates observed in our study. MC-LR was administered by force-feeding in the present study in contrast to the injection method using in the carp and trout studies. The route of exposure is presumed to be an important factor affecting toxicity. Tencalla et al. [51] demonstrated a higher toxicity of MC-LR administered by injection than by force-feeding in rainbow trout.

During the present study, MC-LR equivalent concentrations were detected in liver and muscle from 6 hours until 96 hours after treatment. In both of these organs, a rapid accumulation was observed for both the high and low MC-LR doses. In muscle, the MC-LR equivalent concentration increased for both doses in all of the experiments, and the highest concentrations found for the higher dose. In liver, the maximal MC-LR equivalent concentration was detected after 12 hours for the higher MC-LR dose and 6 hours for the lower dose. Following the peak, a decline in the



**Figure 9. Light microscopy transverse sections of liver control (A) and treated (0.5 µg of MC-LR) (B) YOY perch, stained with periodic acid-Schiff.** Scale bar: 100 µm.  
doi:10.1371/journal.pone.0052243.g009



**Figure 10. DNA damage in YOY perch erythrocytes measured through the comet assay.** Star indicates significant differences between the different treatments and control group values (Mann-Whitney,  $p$ -value $<0.05$ ). doi:10.1371/journal.pone.0052243.g010

MC-LR equivalent concentration was observed for both doses. These findings suggest that MC-LR may have been bound to PPase and thus undetected by our measurement method (ELISA) targeting only free MCs or excreted from the liver during the initial hours of the experiments; such processes may also occur in the field and influence the measurements. Similar results were observed previously on fish force-fed with toxic cyanobacteria [14,52]. Before its excretion, MC-LR undergoes a complex detoxification process that involves various enzymes of which the most studied are the glutathione S-transferases (GSTs) which conjugate MCs to GSH [7]. In the present study, no significant difference in GST activity was observed between the control group and the experimental groups that were force-fed with MC-LR. This finding suggests that MC-LR ingested by YOY perch *via* zooplankton consumption does not induce an increase in the GST activity, which is consistent with other study [53,54]. However in our study, MC-LR concentrations in the livers of YOY perch declined even though there was no change in GST activity. This observation could suggest that the basal level of GST activity in YOY perch was sufficient to detoxify the MCs concentrations that were administered in our fish. Furthermore, it could not be exclude the possible existence of another important MC-LR detoxification pathway involving conjugation of the toxin to molecules containing cystein residues (e.g. polypeptides, PPases) [55].

In the present study, no histological alterations were observed in the experimental groups for any of the organs studied. This finding is not surprising in view of other reports on this topic. Most histological alterations have been observed following immersion, intraperitoneal injection or even force-feeding but with acute doses of MCs [10,56]. The liver, kidneys, gills and intestine are the organs most affected histologically by exposure to MCs. Histological alterations have been observed frequently following exposure to high MC concentrations or to a high biomass of cyanobacteria [15]. Thus, in both *in situ* and experimental studies, MC-LR concentrations are typically too low to induce histological damage in YOY perch. Differences in the administration routes of toxins and in the sensitivity of various fish species to cyanobacterial toxins

are additional factors that may account for the differences in results among studies [15].

A transient increase in DNA damage was observed in perch erythrocytes following treatment with MC-LR, after 12 h and 48 h for the higher and the lower MC-LR dose, respectively. Reactive oxygen species are known to be produced following the exposure of fish to MCs [57,58]. This can partially explain the genotoxicity observed after perch exposure to MC-LR. The possibility cannot be ruled out that the DNA damage observed in perch erythrocytes arises from other pathways such as the production of instable DNA adducts that could be revealed through the comet assay. However, such underlying mechanisms of toxicity remain to be confirmed in fish. Regardless of the MC-LR dose, DNA damage levels returned to those of the control group 4 days after treatment. Such decreases in DNA damage may be explained by DNA repair and/or erythrocyte turnover; it is not possible to take into account the formation of apoptotic erythrocytes during Comet assay image analysis because of the huge number of DNA strand breaks in apoptotic cells [59]. Genotoxic stress was thus observed in perch exposed to environmentally relevant MC-LR doses in terms of the toxin concentration ranges analysed in seston. YOY perch may therefore suffer drastic effects from the major algal blooms observed in peri-alpine lakes. This idea is consistent with the results of a previous study of another lake fish species, the European whitefish (*Coregonus lavaretus*) [60].

*P. rubescens*, a MC-producing cyanobacterium, is found frequently in the metalimnion of peri-alpine lakes during the summer [17,18,33]. The development of *P. rubescens* in this water layer is facilitated by various specialised features such as gas vesicles that adjust the position of the organism in the water column in response to the vertical gradient of irradiance [61], photosynthetic pigments rich in phycoerythrin protein that absorb the entire spectrum of photosynthetic active radiation (PAR) [62] and the excretion of alkaline phosphatases that utilise the organic forms of phosphorus when inorganic phosphate concentrations are low [62]. In the present study, high biomasses of toxic *P. rubescens* were observed in the metalimnion during the summer. However, data



# Effets de *P. rubescens* et des microcystines sur les juvéniles de perche (*P. fluviatilis*)

Impact of Toxic Cyanobacterial Blooms on Perch

concerning the interactions of *P. rubescens* and MCs with fish species in Lake Bourget are still scarce.

In this study, schools of YOY perch were observed in the epilimnion of the pelagic area above the *P. rubescens* blooms. This vertical distribution is consistent with observations in other studies [25,29,63]. YOY perch are present in the epilimnion because of their thermal preferendum for the 16–26°C range [64]. Thus, YOY perch are spatially separated and have no direct contact with *P. rubescens* and their toxins. However, MCs were detected in the liver and muscles of YOY perch, and the maximal MC concentrations for both organs were found in August when the maximal MC concentrations in seston were also observed. MCs accumulation in perch has already reported in bloom conditions by several authors before [28,65,66]. The MCs found in the fish are derived principally from their food sources. *Daphnia* are a major component of the perch diet and are known to be contaminated by MCs; i.e., *Daphnia* ingest filamentous cyanobacteria such as *P. rubescens* and consequently accumulate MCs [67,68]. In Lake Bourget, *Daphnia* therefore appear to be a major vector of MCs to zooplanktivorous fish. The diel vertical migration (DVM) characteristic of *Daphnia* species [69] is an important factor leading to the ingestion of *P. rubescens* filaments. While passing through the metalimnion, *Daphnia* ingest *P. rubescens* filaments, accumulate MCs and are subsequently eaten by YOY perch in the epilimnion. Thus, the YOY perch in the lake are chronically exposed to MC *via* their food sources leading to contamination of fish by MCs. However, our experiment has shown that perch are able to detoxify and excrete a portion of ingested MC and thereby limit their toxin concentration. Such detoxification and excretion processes are active during chronic MC exposure, as indicated by the absence of a continuous increase in MC concentration. However, they do not allow the reduction in MC concentration as observed in our experiments and a significant correlation between MC concentrations in the YOY perch and in seston was observed during the *in situ* study. Our experimental results suggested that the tested MC concentrations did not induce histological damage and our field observation showed that even with chronic exposure the MC concentrations recorded in Lake Bourget did not induce histological damage in YOY perch. Genotoxic impacts were not assessed *in situ* because of the complexity of measuring the effect of a targeted molecule on these parameters under *in situ* conditions. Other substances may well affect these parameters and thereby confound the real impact of MCs on perch. Our laboratory experiments under controlled conditions allowed us to assess the negative genotoxic impact (i.e., DNA damage) of MC-LR on YOY perch and to conclude that similar effects on YOY perch may occur during *P. rubescens* bloom conditions.

Finally, perch are highly commercialized for human consumption and YOY are used to be eaten fry and completely. As a consequence, the results of that study raise questions about the possible human threat linked to the consumption of wild perch.

## References

1. Carmichael WW (1992) Cyanobacteria secondary metabolites: the cyanotoxins. *J Appl Microbiol* 72: 445–459.
2. Azevedo SMF., Carmichael WW, Jochimsen EM, Rinehart KL, Lau S, et al. (2002) Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru Brazil. *Toxicology* 181: 441–446.
3. Mankiewicz-Boczek J, Palus J, Gagala I, Izydorczyk K, Jurczak T, et al. (2011) Effects of microcystins-containing cyanobacteria from a temperate ecosystem on human lymphocytes culture and their potential for adverse human health effects. *Harmful Algae* 10: 356–365.
4. Codd GA, Morrison LF, Metcalfe JS (2005) Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. *Toxicol Appl Pharm* 203: 264–272.
5. Welker M, Von Döhren H (2006) Cyanobacterial peptides nature's own combinatorial biosynthesis. *FEMS microbiol rev* 30: 530–563.

Concentrations in muscle of YOY perch raise 14.2 ng.g<sup>-1</sup> fresh weight (FW) in August during the bloom of *P. rubescens*. The WHO has established recommendations [70] concerning the amount of cyanotoxin that an individual can consume per day for a lifetime, the microcystin total daily intake threshold (TDI) (0.04 µg of microcystin/kg of body weight/day). Thus, with concentrations found in our study in August, a man weighting 80 kg and consuming around 150 g of perch fillets (a typical restaurant portion) absorbs 2.13 µg of microcystin per day which is below the TDI (3.2 µg/day for a man weighting 80 kg). Consequently, the consumption of perch fillets coming from the Lake Bourget seems to be safety for people, even during severe *P. rubescens* bloom as it occurred in 2009 compared to previous years. However, as previously discussed, the methodological biases do not allow a true estimation of the MCY concentrations in the fish tissues analysed. As a consequence, our results clearly underline the human exposure to MCs through the consumption of fish caught during *P. rubescens* blooms but more studies are needed to estimate the real risk link to the consumption of that fish.

## Conclusion

During the *P. rubescens* bloom in Lake Bourget in 2009, YOY perch populations were located in the epilimnion because of their thermal preferendum. The YOY perch were therefore never in direct contact with the *P. rubescens* bloom, which was located in the metalimnion. However, the YOY perch were exposed to MCs through the consumption of *Daphnia*. The MC concentrations ingested by YOY perch in the lake during 2009 did not result in an accumulation of the toxin sufficient to be unsafely for the human consumption or to induce lethal histological damages in fish. Indeed, YOY perch are able to detoxified and excreted rapidly MCs to avoid most of their negative impacts. However, genotoxic damage could occur even at low concentrations of MCs ingested possibly leading long term negative impacts on perch populations.

## Acknowledgments

The authors thank Jean-Christophe Hustache, Michel Colon, Pascal Perney and Raphaël D'Elbee for their technical help during field sampling, Sébastien Cachera (CISALB) and Gérard Paolini (CALB) for their logistical support during field sampling and Leslie Lainé and Jean-Paul Dubois for identification of zooplankton and measurement of fishes. We are grateful to Professor Pascal Fontaine (UR AFPA, Nancy) for providing experimental YOY perch.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: BS OA JG ID NG AD. Performed the experiments: BS NG OA JG ID. Analyzed the data: BS OA JG ID NG AD HH SB FC. Contributed reagents/materials/analysis tools: BS NG HH AD SB FC. Wrote the paper: BS JG OA ID AD SB HH NG FC.

# Effets de *P.rubescens* et des microcystines sur les juvéniles de perche (*P. fluviatilis*)

Impact of Toxic Cyanobacterial Blooms on Perch

- Carbis C, Rawlin G, Mitchell G, Anderson J, McCauley I (1996) The histopathology of carp, *Cyprinus carpio* L., exposed to microcystins by gavage, immersion and intraperitoneal administration. *J Fish Dis* 19: 199–207.
- Ernst B, Hoeger SJ, O'Brien E, Dietrich DR (2006) Oral toxicity of the microcystin-containing cyanobacterium *Planktothrix rubescens* in European whitefish (*Coregonus lavaretus*). *Aquat Toxicol* 79: 31–40.
- Trinchet I, Djediat C, Huet H, Dao SP, Edery M (2011) Pathological modifications following sub-chronic exposure of medaka fish (*Oryzias latipes*) to microcystin-LR. *Reprod toxicol* 32: 329–340.
- Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharm* 13: 57–149.
- Sahin A, Tencalla FG, Dietrich DR, Naegeli H (1996) Biliary excretion of biochemically active cyanobacteria (blue-green algae) hepatotoxins in fish. *Toxicology* 106: 123–130.
- Malbrouck C, Kestemont P (2006) Effects of microcystins on fish. *Environ Toxicol Chem* 25: 72–86.
- Zhang D, Xie P, Liu Y, Qiu T (2009) Transfer, distribution and bioaccumulation of microcystins in the aquatic food web in Lake Taihu, China, with potential risks to human health. *Sci Total Environ* 407: 2191–2199.
- Jacquet S, Briand J-F, Leboulanger C, Avois-Jacquet C, Oberhaus L, et al. (2005) The proliferation of the toxic cyanobacterium *Planktothrix rubescens* following restoration of the largest natural French lake (Lac du Bourget). *Harmful Algae* 4: 651–672.
- Jann-Para G, Schwob I, Feuillade M (2004) Occurrence of toxic *Planktothrix rubescens* blooms in lake Nantua, France. *Toxicol* 43: 279–285.
- Briand JF, Jacquet S, Flinois C, Avois-Jacquet C, Maisonneuve C, et al. (2005) Variations in the microcystin production of *Planktothrix rubescens* (Cyanobacteria) assessed from a four-year survey of Lac du Bourget (France) and from laboratory experiments. *Microbial Ecol* 50: 418–428.
- Paulino S, Valério E, Faria N, Fastner J, Welker M, et al. (2009) Detection of *Planktothrix rubescens* (Cyanobacteria) associated with microcystin production in a freshwater reservoir. *Hydrobiologia* 621: 207–211.
- David J (1967) Pêche, Pêcheurs professionnels, pollution dans le lac du Bourget. *Bull Fr Piscic* 224: 81–94.
- Cuyppers Y, Vincon-Leite B, Groleau A, Tassin B, Humbert J-F (2011) Impact of internal waves on the spatial distribution of *Planktothrix rubescens* (cyanobacteria) in an alpine lake. *ISME J* 5: 580–589.
- Leboulanger C, Dorigo U, Jacquet S, Le Berre B, Paolini G, et al. (2002) Application of a submersible spectrofluorometer for rapid monitoring of freshwater cyanobacterial blooms: a case study. *Aquat Microb Ecol* 30: 83–89.
- Masson S, Angeli N, Guillard J, Pinel-Aloul B (2001) Diel vertical and horizontal distribution of crustacean zooplankton and young of the year fish in a sub-alpine lake: an approach based on high frequency sampling. *J Plankton Res* 23: 1041–1060.
- Guillard J, Fernandes P, Laloe T, Brehmer P (2011) Three-dimensional internal spatial structure of young-of-the-year pelagic freshwater fish provides evidence for the identification of fish school species. *Limnol Oceanogr-Meth* 9: 322–328.
- Simmonds EJ, MacLennan DN (2005) Fisheries acoustics: theory and practice. Blackwell Science. 437 p.
- Sotton B, Anneville O, Cadel-Six S, Domaizon I, Kryš S, et al. (2011) Spatial match between *Planktothrix rubescens* and whitefish in a mesotrophic peri-alpine lake: Evidence of toxins accumulation. *Harmful Algae* 10: 749–758.
- Ibelings BW, Bruning K, De Jonge J, Wolfstein K, Pires LM, et al. (2005) Distribution of microcystins in a lake foodweb: no evidence for biomagnification. *Microbial ecol* 49: 487–500.
- Guillard J, Perga ME, Colon M, Angeli N (2006) Hydroacoustic assessment of young-of-year perch, *Perca fluviatilis*, population dynamics in an oligotrophic lake (Lake Annecy, France). *Fisheries Manag Ecol* 13: 319–327.
- Straskraba M (1964) Preliminary results of a new method for the quantitative sorting of freshwater net plankton into main groups. *Limnol Oceanogr* 9: 268–270.
- Karås P, Thoreson G (1992) An application of a bioenergetics model to Eurasian perch (*Perca fluviatilis* L.). *J Fish Biol* 41: 217–230.
- Smith J, Boyer G (2009) Standardization of microcystin extraction from fish tissues: A novel internal standard as a surrogate for polar and non-polar variants. *Toxicol* 53: 238–245.
- Ernst B, Hitzfeld B, Dietrich D (2001) Presence of *Planktothrix* sp. and cyanobacterial toxins in Lake Ammersee, Germany and their impact on whitefish (*Coregonus lavaretus* L.). *Environmental Toxicology* 16: 483–488.
- Ernst B, Dietz L, Hoeger SJ, Dietrich DR (2005) Recovery of MC-LR in fish liver tissue. *Environmental Toxicology* 20: 449–458.
- Metcalfe JS, Beattie KA, Pflugmacher S, Codd GA (2000) Immuno-cross-reactivity and toxicity assessment of conjugation products of the cyanobacterial toxin, microcystin-LR. *FEMS Microbiol Lett* 189: 155–158.
- McElhinney J, Lawton LA (2005) Detection of the cyanobacterial hepatotoxins microcystins. *Toxicol Appl Pharm* 203: 219–230.
- Narendra PS, McCloy MT, Tice RR, Schneider EL (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175: 184–191.
- Boysen EA, Old LJ, Chouroulinkov I (1964) Cytotoxic test for demonstration of mouse antibody. *Methods Med Res* 10: 39–47.
- Collins AR (2004) The comet assay for DNA damage and repair. *Mol Biotechnol* 26: 249–261.
- Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL (1995) The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res-Rev Genet* 339: 37–59.
- Brancroft JD, Marylin G (2008) Theory and practice of histological techniques. Churchill Livingstone. 725 p.
- Craig M, Anh Liu H, McCready TL, Holmes CFB, Williams D, et al. (1996) Molecular mechanisms underlying the interaction of motuporin and microcystins with type-I and type-2A protein phosphatases. *Biochem Cell Biol* 74: 569–578.
- MacKintosh RW, Dalby KN, Campbell DG, Cohen PTW, Cohen P, et al. (1995) The cyanobacterial toxin microcystin binds covalently to cysteine-273 on protein phosphatase 1. *FEBS Lett* 371: 236–240.
- Dawson RM (1998) The toxicology of microcystins. *Toxicol* 36: 953–962.
- Neffling M-R, Lance E, Meriluoto J (2010) Detection of free and covalently bound microcystins in animal tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Environ pollut* 158: 948–952.
- Williams DE, Craig M, Dawe SC, Kent ML, Andersen RJ, et al. (1997) 14C-labelled microcystin-LR administered to Atlantic salmon via intraperitoneal injection provides in vivo evidence for covalent binding of microcystin-LR in salmon livers. *Toxicol* 35: 985–989.
- Williams DE, Craig M, Dawe SC, Kent ML, Holmes CFB, et al. (1997) Evidence for a Covalently Bound Form of Microcystin-LR in Salmon Liver and Dungeness Crab Larvae. *Chem Res Toxicol* 10: 463–469.
- Anneville O, Souissi S, Gammeter S, Straile D (2004) Seasonal and inter-annual scales of variability in phytoplankton assemblages: comparison of phytoplankton dynamics in three peri-alpine lakes over a period of 28 years. *Freshwater Biol* 49: 98–115.
- D'alelio D, Gandolfi A, Boscaini A, Flaim G, Tolotti M, et al. (2011) *Planktothrix* populations in subalpine lakes: selection for strains with strong gas vesicles as a function of lake depth, morphometry and circulation. *Freshwater Biol* 56: 1481–1493.
- Räbergh CMI, Bylund G, Eriksson JE (1991) Histopathological effects of microcystin-LR, a cyclic peptide toxin from the cyanobacterium (blue-green alga) *Microcystis aeruginosa* on common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquat Toxicol* 20: 131–145.
- Tencalla FG, Dietrich DR, Schlatter C (1994) Toxicity of *Microcystis aeruginosa* peptide toxin to yearling rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat Toxicol* 30: 215–224.
- Tencalla F, Dietrich D (1997) Biochemical characterization of microcystin toxicity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicol* 35: 583–595.
- Li X, Liu Y, Song L, Liu J (2003) Responses of antioxidant systems in the hepatocytes of common carp (*Cyprinus carpio* L.) to the toxicity of microcystin-LR. *Toxicol* 42: 85–89.
- Malbrouck C, Trausch G, Devos P, Kestemont P (2003) Hepatic accumulation and effects of microcystin-LR on juvenile goldfish *Carassius auratus* L. *Comp Biochem Phys C* 135: 39–48.
- Zhang D, Yang Q, Xie P, Deng X, Chen J, et al. (2012) The role of cysteine conjugation in the detoxification of microcystin-LR in liver of bighead carp (*Aristichthys nobilis*): a field and laboratory study. *Ecotoxicology* 21: 244–252.
- Fischer WJ, Dietrich DR (2000) Pathological and Biochemical Characterization of Microcystin-Induced Hepatopancreas and Kidney Damage in Carp (*Cyprinus carpio*). *Toxicol Appl Pharm* 164: 73–81.
- Jos A, Pichardo S, Prieto AI, Repetto G, Vázquez CM, et al. (2005) Toxic cyanobacterial cells containing microcystins induce oxidative stress in exposed tilapia fish (*Oreochromis* sp.) under laboratory conditions. *Aquat. Toxicol.*, 72(3), 261–271. doi:10.1016/j.aquatox.2005.01.003.
- Prieto A, Jos A, Pichardo S, Moreno I, Camean A (2006) Differential oxidative stress responses to microcystins LR and RR in intraperitoneally exposed tilapia fish (*Oreochromis* sp.). *Aquat. Toxicol.*, 77(3), 314–321. doi:10.1016/j.aquatox.2005.12.012.
- Olive PL, Frazer G, Banath JP (1993) Radiation-Induced Apoptosis Measured in TK6 Human B Lymphoblast Cells Using the Comet Assay. *Radiat res* 136: 130–136.
- Sotton B, Devaux A, Givaudan N, Guillard J, Domaizon I, et al. (2012) Short-term uptake of microcystin-LR by *Coregonus lavaretus*: GST activity and genotoxicity. *Ecotoxicology* 21: 1788–1796.
- Walshy AE, Schanz F, Schmid M (2006) The Burgundy-blood phenomenon: a model of buoyancy change explains autumnal waterblooms by *Planktothrix rubescens* in Lake Zürich. *New phytol* 169: 109–122.
- Feuillade J. (1994) The cyanobacterium (blue-green algae) *Oscillatoria rubescens* D.C. *Arch Hydrobiol. Ergebn Limnol* 41: 77–93.
- Probst WN, Thomas G, Eckmann R (2009) Hydroacoustic observations of surface shoaling behaviour of young-of-the-year perch *Perca fluviatilis* (Linnaeus, 1758) with a towed upward-facing transducer. *Fish Res* 96: 133–138.
- Wang N, Eckmann R (1994) Distribution of perch (*Perca fluviatilis* L.) during their first year of life in Lake Constance. *Hydrobiologia* 277: 135–143.
- Wilson AE, Gossiaux DC, Hook TO, Berry JP, Landrum PF, et al. (2008) Evaluation of the human health threat associated with the hepatotoxin microcystin in the muscle and liver tissues of yellow perch (*Perca flavescens*). *Canadian journal of fisheries and aquatic sciences* 65: 1487–1497.
- Gkellis S, Lanaras T, Sivonen K (2006) The presence of microcystins and other cyanobacterial bioactive peptides in aquatic fauna collected from Greek freshwaters. *Aquat Toxicol* 78: 32–41.

## Effets de *P.rubescens* et des microcystines sur les juvéniles de perche (*P. fluviatilis*)

### Impact of Toxic Cyanobacterial Blooms on Perch

67. Repka S (1997) Effects of food type on the life history of *Daphnia* clones from lakes differing in trophic state. I. *Daphnia galeata* feeding on *Scenedesmus* and *Oscillatoria*\*. *Freshwater Biol* 38: 675–683.
68. Oberhaus L, Briand JF, Lebourlanger C, Jacquet S, Humbert JF (2007) Comparative effects of the quality and quantity of light and temperature on the growth of *Planktothrix agardhii* and *P. rubescens* I. *Journal of Phycology* 43: 1191–1199.
69. Hays GC (2003) A review of the adaptive significance and ecosystem consequences of zooplankton diel vertical migrations. *Hydrobiologia* 503: 163–170.
70. Chorus I, Bartram J (1999) Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management. E & FN Spon, London. 400 p.



## 5 Transfert trophique des microcystines dans les réseaux trophiques pélagiques

### 5.1 Rôle des organismes zooplanctoniques dans le transfert trophique jusqu'aux poissons

#### 5.1.1 Contexte d'étude

Le compartiment zooplanctonique, compartiment vecteur de matière et d'énergie des producteurs primaires aux poissons, constitue un maillon essentiel des réseaux trophiques aquatiques. La structure du compartiment zooplanctonique dépend notamment des changements qui peuvent s'opérer dans la composition et dans la qualité de la ressource phytoplanctonique disponible (Ghadouani et al., 1998; Hansson et al., 2007; Yang et al., 2012). Ainsi, lors des blooms de cyanobactérie, des changements dans la composition zooplanctonique conduisant souvent à l'exclusion des espèces de grande taille au profit des plus petites espèces. De par leur morphologie, l'absence de certains composés essentiels et la présence de toxines, les cyanobactéries sont en effet considérées comme une ressource de faible qualité nutritionnelle pour le zooplancton herbivore avec cependant des effets qui semblent différer en fonction des espèces zooplanctoniques (De Bernardi et Giussani, 1990). En milieu naturel, des mesures de MCS sur le zooplancton ont pu révéler la capacité du zooplancton à consommer les cyanobactéries et ceci malgré les effets négatifs qui peuvent en résulter (Ferrão-Filho et al., 2002; Ibelings et al., 2005; Ferrão-Filho et Kozlowsky-Suzuki, 2011). Dans un contexte de bloom de cyanobactéries, le compartiment zooplanctonique peut donc constituer une source de MCs pour les poissons. Cependant, le transfert des MCs au sein des réseaux trophiques planctoniques a rarement été observé (Laurén-Määttä et al., 1995; Ibelings et al., 2005; Smith et Haney, 2006). Au cours des blooms estivaux de *P. rubescens*, les juvéniles de perche et les corégones, tous deux zooplanctonophages sont susceptibles d'ingérer des MCs *via* la consommation de zooplancton. Cependant, les sources précises de MCs jusqu'aux poissons ne sont encore connues. Dans le lac d'Hallwil (Suisse), des blooms métalimniques de *P. rubescens* se développent en été et des mortalités massives de daphnies ont pu être observées à la surface de l'eau lors de ces blooms (Baumann et Jüttner 2008). Ainsi, il se peut que la contamination des poissons

zooplanctonophages par les MCs soit liée à l'ingestion de zooplancton contaminé. Les niveaux d'accumulation en MCs dans les poissons sont susceptibles de varier en fonction de divers paramètres tels que leur régime alimentaire, la composition taxonomique du zooplancton herbivore, la répartition spatiale des espèces, des processus de détoxification. Ainsi cette étude se propose d'évaluer au cours d'un cycle nycthéral les concentrations en *P. rubescens* et en MCs présentes dans le lac et d'évaluer la répartition verticale ainsi que le niveau de contamination en MCs pour différents genres zooplanctoniques. Les résultats obtenus nous permettront d'identifier d'éventuelles perturbations dans les processus de migrations du zooplancton ainsi qu'un transfert trophique potentiel des MCs entre ces taxa. En parallèle, les régimes alimentaires des juvéniles de perche et des corégones seront identifiés et l'accumulation des MCs mesurée afin de déterminer le(s) vecteur(s) principal(aux) de MCs pour chaque espèce piscicole. L'objectif à terme est d'évaluer si ces deux espèces, fortement commercialisées, sont susceptibles d'accumuler des MCs et si des différences d'accumulation existent entre elles.

### 5.1.2 Résumé de l'étude

Le rôle du zooplancton en tant que vecteur des MCs dans les réseaux trophiques a été évalué au cours d'un cycle nycthéral lors d'un bloom de *P. rubescens* sur le lac d'Hallwil. Les concentrations en MCs dans le seston (composé en forte majorité par les filaments de cyanobactérie) et le zooplancton ont été mesurées dans les différentes couches d'eau (épi- méta- hypolimnion) à différents temps d'échantillonnage. De plus, les MCs ont été mesurées dans les corégones, poissons zooplanctonophages localisés dans le métalimnion et l'hypolimnion supérieur, ainsi que dans des juvéniles de perche capturés en zone littorale du lac. Des variations dans la production de MCs par les filaments de *P. rubescens* et dans les concentrations présentes dans les différents taxa zooplanctoniques ont été observées au cours du cycle nycthéral avec des concentrations maximum relevées au crépuscule. La présence de *P. rubescens* dans le bol alimentaire des *daphnies*, des *bosmines* et des larves de *Chaoborus* a été vérifiée en ciblant l'ADN cyanobactérien dans les contenus intestinaux. Ces résultats suggèrent que les filaments de la cyanobactérie constituent une ressource alimentaire pour les organismes zooplanctoniques au cours des périodes de blooms plus particulièrement dans la zone métalimnique pour les cladocères herbivores. La présence de MCs dans les larves de *Chaoborus* met en avant pour la première fois, l'existence d'un transfert trophique de cyanotoxines entre le zooplancton herbivore

## Transfert trophique des microcystines dans les réseaux trophiques pélagiques

et ses prédateurs invertébrés. Nos résultats suggèrent que le transfert des MCs dans les réseaux trophiques planctoniques emprunte des voies trophiques complexes et que les organismes zooplanctoniques herbivores sont des vecteurs de MCs en encapsulant les cyanobactéries et leurs toxines. Par conséquent, le zooplancton contribue significativement à la contamination des corégones, mais également des juvéniles de perche présents en zone littorale où les blooms de *P. rubescens* sont absents (dans le lac étudié).

### 5.1.3 Article 4

#### ***In situ* trophic transfer of microcystin throughout the lake pelagic food web: evidence of the role of zooplanktonic vectors in fish contamination**

Benoît Sotton <sup>a,\*</sup>, Jean Guillard <sup>a</sup>, Orlane Anneville <sup>a</sup>, Marjorie Maréchal <sup>a</sup>, Olga Savichtcheva <sup>a</sup>,  
Isabelle Domaizon <sup>a</sup>

a) INRA, UMR CARRTEL, 75 av. de Corzent, F-74203 Thonon Les Bains, France.

\* Corresponding author: INRA, UMR CARRTEL, 75 av. de Corzent, F-74203 Thonon Les  
Bains, France. Phone: +33 4 50 26 78 07, Fax: +33 4 50 26 07 60

Email addresses:

bsotton@gmail.com (B. Sotton)\*  
jean.guillard@thonon.inra.fr (J. Guillard)  
orlane.anneville@thonon.inra.fr (O. Anneville)  
marjo.marechal@gmail.com (M. Maréchal)  
osavichtcheva@gmail.com  
isabelle.domaizon@thonon.inra.fr (I. Domaizon)

Keywords: peri-alpine lakes, cyanobacteria, microcystins, trophic transfer, food web, zooplankton, whitefish.

### **Acknowledgements**

The authors would like to thank Jean-Christophe Hustache, Michel Colon and Pascal Perney for their technical help during field sampling and analyses. They also want to thank particularly Cécile Chardon who performed some of the DNA analyses presented in this paper. B.S.'s PhD is a CIBLE project funded by the Rhône-Alpes region. M.M.'s CDD and experiments were financed by ONEMA (Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques). We are grateful to the access to samples from Hallwil by Arno Stöckli (Department Bau, Verkehr, Umwelt, Aargau, Switzerland) and for his help and collaboration during field sampling.

## Abstract

An *in situ* approach was used to investigate the role of zooplankton as vectors of microcystins (MCs) from *P. rubescens* filaments to fish, during a 24 hours survey in Lake Hallwil when a metalimnic bloom of *P. rubescens* occurred. MCs concentrations in *P. rubescens* and zooplankton were assessed in different water strata (epi- meta- and hypolimnion) at different sampling times. In parallel MCs were quantified in the whitefish, a zooplanktivorous fish located in the metalimnion. Variations in MCs production by *P. rubescens* cells were observed during the circadian cycle, with maximum concentrations at dusk, concomitantly the highest MCs concentrations were also detected in zooplankton species. The presence of *P. rubescens* in the diet of various zooplanktonic taxa (*Daphnia*, *Bosmina* and *Chaoborus*) was verified targeting the cyanobacterial DNA in their gut content. These results suggest that toxic cyanobacterial cells constitute a food resource for these zooplanktonic taxa during bloom periods. The presence of MCs in *Chaoborus* larvae highlighted for the first time the trophic transfer of MCs between herbivorous zooplankton and their invertebrate predators. Our results suggest that the transfer of MC within planktonic food webs might follow complex trophic pathways and that zooplanktonic herbivores act as vectors by encapsulating cyanobacteria they grazed and consequently contribute significantly to whitefish (and probably other zooplanktivorous fish) contamination.

## **Introduction**

Mass eutrophication of freshwater ecosystems during the 20<sup>th</sup> century has led to a destabilization in structure and functioning of pelagic food webs (Smith and Schindler 2009). One of the most common consequences of these exacerbated nutrient inputs is a shift in the composition of primary producers with the appearance of noxious autotrophic bacteria, the cyanobacteria (O'Neil et al. 2012). The presence of cyanobacteria in freshwater ecosystems is generally associated with the appearance of ecological disturbances. Indeed, cyanobacteria are known to produce a large variety of toxic metabolic compounds which interact with other trophic compartments (Wiegand and Pflugmacher 2005; Van Apeldoorn et al. 2007; Martins and Vasconcelos 2009). Microcystins are probably the most widespread cyanotoxins found in freshwater lakes and they are known to cause multiple adverse effects on phytoplanktonic, zooplanktonic and fish compartments (Babica et al. 2006; Malbrouck and Kestemont 2006; Wilson et al. 2006).

Metazooplankton is responsible for the transfer of matter and energy from primary producers up to the fish compartment, and consequently represent a key food web component in freshwater ecosystems (Lampert 1997). Despite the fact that cyanobacteria could constitute a carbon source for zooplankton organisms (de Kluijver et al. 2012), they generally negatively affect total biomass and composition of zooplankton community due to their shape/morphology and toxins production (Hansson et al. 2007). However, zooplankton species are known to contain microcystins (MCs) which indicates that they graze on cyanobacteria and/or contaminated prey (Oberholster et al. 2006; Davis et al. 2011; Ferrão-Filho and Kozlowsky-Suzuki 2011). Thus, zooplankton organisms could transport MCs and thus act as vectors of cyanotoxins for fish species in freshwater ecosystems where cyanobacterial blooms occur (Teegarden et al. 2003).

Indeed zooplanktonic organisms constitute a major part of fish diet either during all their life or at least during early ontogenic phase (DeVries and Stein 1992). In *in-situ* conditions, several studies have already highlighted the presence of MCs in various fish species (Martins and Vasconcelos 2009; Sotton et al. 2011; Ferrão-Filho and Kozlowsky-Suzuki 2011). Additionally, some field studies also reported that cyanotoxins can be detected in different zooplankton species and evidenced the presence of MCs at multiple trophic levels (Kotak et al. 1996; Ibelings et al. 2005; Lehman et al. 2010). However, up to now there is actually a lack of knowledge about the main vectors of MCs and the efficiency of MCs intake by fish species that may vary from one ecosystem to another according notably to the type of cyanobacteria (e.g. surface or metalimnic blooms), the ability/advantage of zooplankton to avoid cyanobacteria as food resource, the diet and spatial distribution zooplanktivorous fish.

In Lake Hallwil (Switzerland), *Planktothrix rubescens*, a toxic cyanobacterium which produces mainly MC-RR and MC-LR and their (de)methylated analogues (Briand et al. 2005; Ernst et al. 2009), forms yearly metalimnic blooms and also occasionally surface scums. In this meso-eutrophic lake (Ostermaier and Kurmayer 2010), massive mortality of zooplankton and especially of *Daphnia* have been observed during a *P. rubescens* bloom but the underlying causes of intoxication (e.g. consumption of filaments, balneation in MCs) were not identified (Baumann and Jüttner 2008). Furthermore, whitefish (*Coregonus suidteri*) dominate pelagic fish community of Lake Hallwil (Enz et al. 2001). Whitefish are particularly important in the entire peri-alpine region due to their commercial values. Therefore the risk of MCs accumulation in this fish species is of special sanitary interest. Whitefish are situated below the thermocline due to their thermal preferendum (Mehner et al. 2010), and thus are positioned in the water layer where metalimnic blooms of *P. rubescens* occur (Sotton et al. 2011) which increase the risk of direct ingestion of filaments or accumulation of dissolved MCs. However, for this zooplanktivorous



species, a more relevant way of contamination is a trophic transfer of MCs from their zooplanktonic or invertebrate preys (Sotton et al. 2011). Indeed, these preys might have various levels of MCs contamination according to their diet, migratory pattern and their contact/ingestion of cyanobacterial filaments. We know that vertical distribution of zooplankton is partly influenced by the circadian cycle in response to the predation pressure exerted by fish (Hays 2003). By migrating between deep-water layers and upper epilimnion, zooplankton could ingest *P. rubescens* filaments and then transfer MCs to fish, even when fish is not in direct contact with *P. rubescens* bloom.

In this study we performed a multi-compartment *in-situ* approach (1) to evaluate during a circadian cycle the vertical position of the *P. rubescens* maximum abundance, and the vertical distribution of MCs concentrations, (2) to decrypt the way by which zooplanktonic taxa were contaminated by MCs, for this purpose we applied DNA analyses targeting specifically *P. rubescens* in zooplankton gut contents, (3) to evaluate the levels of accumulation of MCs in various zooplankton species, and identify the link between zooplankton vertical migration and a potential circadian variability in their MCs content, (4) to measure the MCs accumulations by whitefish and the importance of zooplankton species in the trophic transfer of MCs to this fish.

## **Material and methods**

### ***Study site and sampling design***

Lake Hallwil is a meso-eutrophic lake (Ostermaier and Kurmayer 2010) located in the northern part of Switzerland (47°18'N, 08°12'E). It was formed after the last ice age, some 10,000 years ago. Its surface area covers 10.3 km<sup>2</sup>, its maximum depth is 48 m (average depth of

28.6 m). Furthermore, every year mass developments of *P. rubescens* occur.

Measurements and sampling were performed at one central station of the Lake where the maximum depth is reached. Sampling was performed during a circadian cycle and samples were taken at dawn (5h30-7h30), day (13h30-15h30), dusk (20h30-22h30) and night (00h30-02h30), in the epilimnion (0-12 m), metalimnion (12-19 m) and hypolimnion (19-40m). These water layers were defined according to the vertical thermal profiles obtained at each sampling time with a multiparameter probe (see after).

### ***P. rubescens* abundance from in situ measurement and microscopic counting**

At each sampling point, calibrated (*ex situ*) BBE Fluoroprobe (Moldaenke, Germany) was used to estimate the vertical distribution of *P. rubescens* biomass (Leboulanger et al., 2002). Simultaneously, a multiparameter probe (Seabird 19plus, Sea-Bird Electronics, Inc., USA) was used to determine the thermocline depth and to discriminate the different water layers (epilimnion, metalimnion, hypolimnion). Water samples were taken in each of the 3 layers by pumping 20 L of water within each 'strata'. Then, for each water layer, a subsample (around 250 mL) was filtered through a 1- $\mu$ m filter (Nucleopore, Whatman) and stored at -20°C until microcystin analysis. A second sub-sample (100 mL) was preserved in Lugol's iodine solution for *P. rubescens* counting which was performed by using the Utermöhl technique coupled with inverted microscope (Axiovert 135, Zeiss).

### ***Zooplankton sampling and counting***

Zooplankton was collected from integrated samples in the three water strata (epilimnion, metalimnion, hypolimnion) using a 22-cm wide and 175- $\mu$ m mesh biconical closing net

(Asptein's type) towed at low speed across each water layer.

For zooplankton counting, samples were fixed in 4% formaldehyde. Due to the large volume of water sampled, the enumeration of the entire sample was not possible, therefore counts were made on 3 sub-samples for each water layer. Sub-samples were enumerated with an Olympus BX 40 stereo microscope at 10× magnification.

For microcystin analysis and DNA-based diet analysis, 3 closing nets were done in each layer, pooled and carbonated water was added to separate Cladocerans from other zooplankton. Then, Cladocerans were collected and the water containing other zooplankton taxa was filtered through a 1mm mesh to collect *Chaoborus* larvae. All samples were kept at -20 °C until laboratory sub-sampling and analysis. In laboratory, for both MCs and DNA analyses, zooplankton was carefully washed with ADaM medium (Klüttgen et al. 1994) to remove the attached *P. rubescens* filaments. Then, 3 sub-samples of *Daphnia* sp., *Bosmina* sp., and *Chaoborus* larvae per water layer, and per sampling time, were prepared for microcystin analysis. Similarly, for DNA analyses, 2 sub-samples of each species were collected per each water layer and sampling time with 15 *Daphnia*, 30 *Bosmina* and 10 *Chaoborus* larvae.

### ***DNA-based molecular analyses of zooplankton diet***

In order to trace the presence of *P. rubescens* in the intestinal content of zooplankton taxa, a quantification of *P. rubescens* DNA was performed from DNA extracts obtained from *Daphnia*, *Bosmina* and *Chaoborus* larvae.

#### ***DNA extraction***

The small size of cladocerans makes dissection of their stomachs impractical; therefore,

DNA was extracted from the whole animals. One sample of *Daphnia*, *Bosmina* and *Chaoborus* contains respectively 15, 30 and 10 individuals, respectively. We extracted DNA from 74 samples originating either from epi-, méta- or hypolimnion, and constituted by 29 *Daphnia*'s samples, 18 *Bosmina*'s samples and 17 *Chaoborus* samples.

The efficiency of DNA recovery from algal prey inside the cladocerans was compared using the four DNA extraction methods (Savitcheva et al., in prep.). GenElute method (modified from Jardillier et al. (2010) was chosen and applied to extract the DNA for *Daphnia*, *Bosmina*, and *Chaoborus* larvae sampled in Lake Hallwil.

#### *Quantitative PCR assays*

A multiplex Taq nuclease assay (TNA) was applied to enumerate *Planktothrix*, based on 16S rRNA genes (primers are F16S ATCCAAGTCTGCTGTTAAAGA and R16S CTCTGCCCCTACTACTCTAG, associated with probe P16S : FAM-AAAGGCAGTGGAACTGGAAG-BHQ1; as described in Savichtcheva et al 2011). Amplifications were performed in triplicates using a Rotor Gene 3000 instrument with software version 6.0 (Corbett Research, MortLake, NSW, Australia). The reaction mix (25 µl) contained 12.5 µl of 2× QuantiTect Probe PCR Master Mix (Qiagen), 300 nM of each primer, 200 nM of each TaqMan probe and 2 µl of template DNA. No-template controls and respective positive controls were included in all runs. The TaqMan probes had a fluorescent reporter dye (6-carboxyfluorescein, 6-FAM) covalently attached to the 5'-end and black hole quencher-1 (BHQ-1) dye. TNA reactions were initiated by 15 min at 95 °C to activate the hot star polymerase, followed by 45 cycles of a two-step PCR, consisting of a denaturation step at 95 °C for 15 s and subsequent annealing and elongation steps at 60 °C for 60 s.

Tenfold dilution standards were prepared from genomic DNA (gDNA) for qPCR assay, ranging from 2.5 to  $2.5 \times 10^{-5}$  ng gDNA $\mu$ l<sup>-1</sup> in order to create the standard curves. The 16S rRNA gene copy number of the standard strain DNAs was calculated as described before (Savichtcheva et al. 2011). Cq values (MIQE guidelines (Bustin et al., 2009) of the samples were determined for each TNA assay by importing respective standard curve from each qPCR assay and adjusting it to the Cq values of the  $10^{-4}$  or  $10^{-5}$  gDNA standard used as respective positive controls in each run.

Finally the results were expressed as copies number of *P. rubescens* genes per individuals (*Daphnia* or *Bosmina* or *Chaoborus* larvae)

### ***Fish distribution, sampling and stomach contents***

Whitefish distribution in the water column was recorded during day and night using hydroacoustics (EK60, 70 kHz Split-beam) as described previously in Sotton et al. (2011).

During the study, Whitefish were caught once at dawn using a pelagic net, positioned below the thermocline, from a commercial fisherman. Fish were conserved at 4 °C until laboratory. At the laboratory, whitefish (n=16) were measured, weighted, liver and muscle sampled on each fish for MCs analysis. Individual stomach contents (n=16) were collected, fixed in ethanol 70% and then observed under microscope (magnification 40X). Ingested preys were identified and counted at the genus level.

### ***Extraction and analyses of microcystins***

For microcystin analysis in *P. rubescens*, the extraction and measurement procedures described by Sotton et al. (2011) were used. Zooplankton and whitefish samples were grounded and homogenised in 100% methanol. Then, samples were sonicated in an ultrasonic bath (Elma

Sonic) for 5 min and centrifuged (Beckman AVANTI J30 I) at 24000 g for 45 min at -5°C to precipitate the co-extracted proteins (Smith and Boyer 2009). This extraction procedure was repeated twice. Then, both supernatants of each extraction were collected with a 5 mL syringe and washed with hexane; the methanol layer was filtered through a 0.2 µm syringe filter (PTFE, Whatman) and then pooled and evaporated at 40°C to dryness with a Speedvac device (Speedvac Plus SC110A, Savant). Finally, dry extracts were dissolved in an adequate volume of Milli-Q water, which varied among the samples. An ELISA analysis was performed according to the Microcystins (Adda-specific) Plate Kit (Abraxis LLC) (Ernst et al. 2005; Wood et al. 2006). The absorbance was determined in a microplate reader (Dynex MRX II, Dynex Technologies, Inc, USA) at a wavelength of 450 nm. The results are reported as nanograms of MC-LR equivalents per gram of fresh weight (FW). This quantification method was chosen for its sensitivity and specificity to analyse free microcystin concentrations but does not allow to discriminate the pure MC-LR from its metabolites and may lead to an overestimation of the pure MC-LR concentrations in our samples (Metcalf et al. 2000; McElhiney and Lawton 2005).

### ***Data analysis***

For each sampling time and each water layer, sestonic microcystins concentrations (LR and RR) were calculated by the mean of three MC analyses and expressed in µg.L<sup>-1</sup>. Total MCs productivities in metalimnion (µg MCs.µg<sup>-1</sup> *P.rub*) correspond to the mean total MCs concentrations divided by the mean *P. rubescens* concentrations (calculation performed in metalimnion at each sampling time).

Relative abundances of each zooplanktonic taxa during the whole study were calculated by the mean proportion of each taxa in the whole water column for the different sampling times. It is

worth mentioning that *Chaoborus* larvae abundances must be considered with caution, due to the low relevance of the net sampling strategy poorly adapted to this particular species.

Spatio-temporal distributions of *Daphnia* and *Bosmina* were determined by calculating, for each species and at each sampling time, the ratio between the number of individuals found in each water layer (epilimnion, metalimnion, hypolimnion) and the total abundance of the given species in the whole water column.

*P. rubescens* ingestions by each zooplanktonic species and in respective water layer were obtained from the DNA-based qPCR analyses. Maximum and minimum values obtained from qPCR assays, as well as the average for all values observed during the circadian cycle, are given and expressed in number of *P. rubescens* gene copies per organism.

For each water layer and each sampling time, MC-LR equivalent concentrations of *Daphnia*, *Bosmina*, and *Chaoborus* are represented by the average of three MC analyses performed for each species and are expressed in  $\text{ng.g}^{-1}$  of fresh weight.

Total MC-LR Eq. concentrations transported by zooplankton species at each sampling time and in each water layer were calculated using for each zooplankton species, the MC-LR Eq. concentrations ( $\text{ng.g}^{-1}$  FW), the abundance of the species ( $\text{ind.m}^{-3}$ ) and the estimated mean fresh weight of one individual of the given species (*Chaoborus*  $\approx 1.5 \text{ mg. ind}^{-1}$ , *Daphnia*  $\approx 0.83 \text{ mg. ind}^{-1}$  and *Bosmina*  $\approx 0.24 \text{ mg. ind}^{-1}$ ). In each water layer and for each sampling time, the weight of each species was calculated ( $\text{g.m}^{-3}$ ) and MC-LR Eq. concentration ( $\text{ng.m}^{-3}$ ) deduced. Then concentrations transported, by each species in each water layer and at each sampling time, were added to have total MC-LR Eq. concentrations ( $\text{ng.m}^{-3}$ ).

The results of analyses performed on gut content of whitefish ( $n = 16$ ) were expressed as observation frequency (%) of each zooplanktonic species based on their cumulative abundances. Observation frequency was calculated from the ratio between the number of fish where a given

species was present in gut contents and the total number of analyzed gut contents ( $n=16$ ). Then, cumulative abundances correspond to the addition of total quantities of each zooplanktonic species found in all gut contents of each fish species.

From the gut content analysis, concentrations of total MCs brought by the preys ( $\text{ng MCs.gut content}^{-1}$ ) were estimated according to the average of MC-LR Eq. concentrations ( $\text{ng.g}^{-1}$  FW) found in zooplanktonic preys (at dawn and dusk which correspond to maximum food intake period for fish) from metalimnion (where whitefish feed due to higher abundance of zooplankton than in hypolimnion), the abundance ( $\text{ind.gut content}^{-1}$ ) of each zooplanktonic taxon and the mean individual fresh weight for each species (*Chaoborus*  $\approx 1.5 \text{ mg. ind}^{-1}$ , *Daphnia*  $\approx 0.83 \text{ mg. ind}^{-1}$  and *Bosmina*  $\approx 0.24 \text{ mg. ind}^{-1}$ ).

MC-LR equivalent concentrations in liver and muscle of YOY perch and whitefish (Fig. 8) are represented by the mean of three MC analyses for each species and each organ and, are expressed in  $\text{ng.g}^{-1}$  of fresh weight.

### ***Statistical analysis***

All statistical analyses of data were performed with nonparametric Kruskal-Wallis test followed by multiple pairwise comparisons using the procedure of Conover-Iman. Significant differences were determined at the  $p < 0.01$  and  $0.05$  levels for all of the statistical analyses. The statistical analyses were performed with the software XLSTAT 2011.

## **Results**

### ***Spatial distribution and diet of whitefish***



Echograms from Lake Hallwil showed that during day and night (Fig 1AB) individual fish (mainly represented by whitefish) were located below the thermocline.

On average, the sampled whitefish had a size of  $24.4 \pm 0.976$  cm and weigh  $244.8 \pm 35.8$  g. Their gut contents were dominated by *Chaoborus* larvae which were observed in high abundances for all analyzed whitefish (n=16) (Fig. 2). Then, *Daphnia* were present in 80 % of the analyzed gut contents but in lower quantity (1528 ind. for all gut contents) compared to *Chaoborus* larvae (12830 ind. for all gut contents) (Fig. 2). *Bosmina* were retrieved approximately in the same quantity as *Daphnia* but they were observed only in 20 % of the analyzed whitefish gut contents (Fig 2). Finally, *Leptodora* were also observed in 27 % of the analyzed whitefish gut contents but in lower quantities than others preys (Fig. 2).

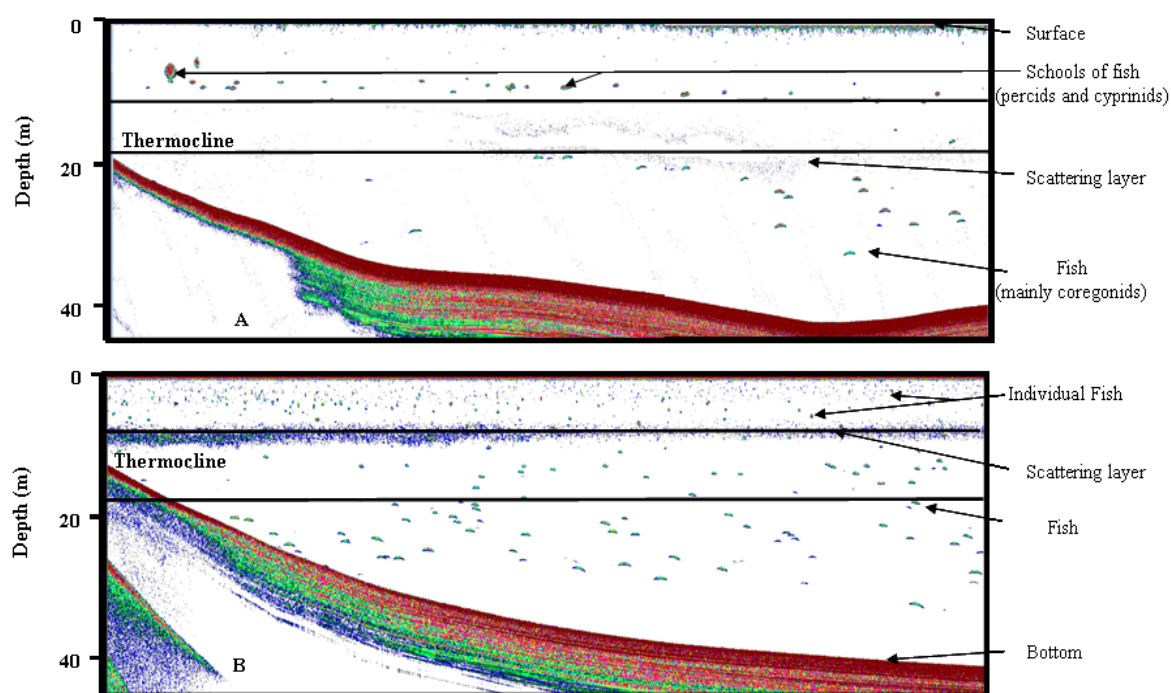


Figure 1: Examples of results from hydroacoustics showing the spatial repartition of different fish species and macro-zooplankton (i.e. *Chaoborus*) at day (A) and night (B)

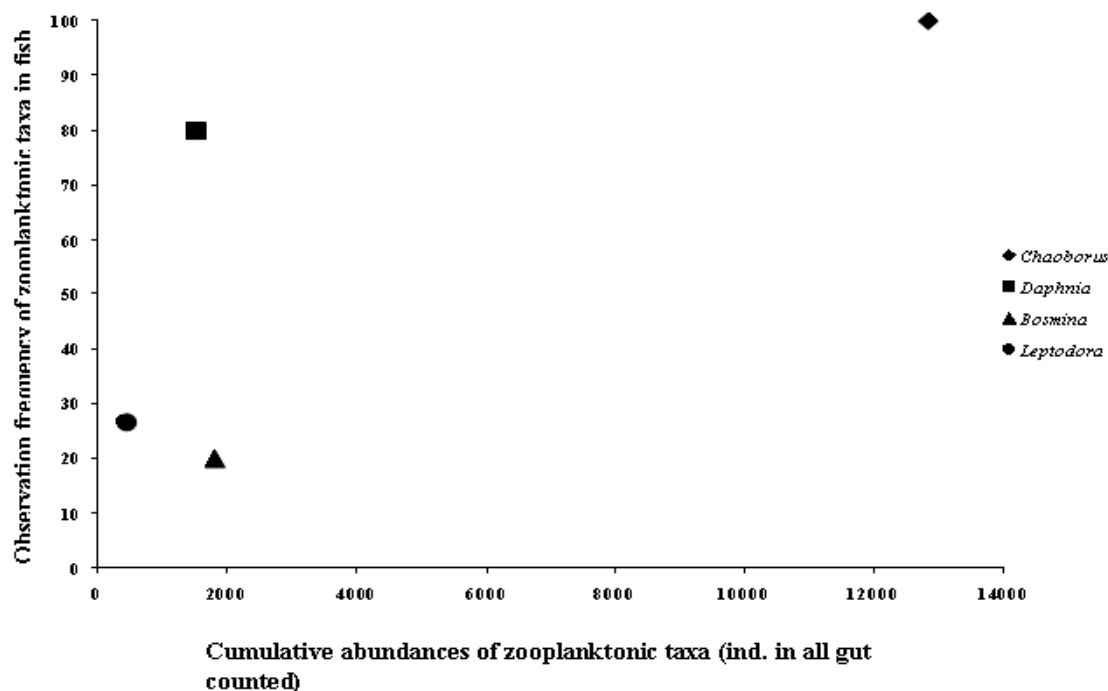


Figure 2: Gut content composition of whitefish of Lake Hallwil

### *P. rubescens* abundances, MCs concentrations and productivities in *P. rubescens*

Regardless of the sampling period, *P. rubescens* peaks were found in the metalimnion between 12 and 19 meters depth (Fig. 3). *P. rubescens* concentration fluctuated between 86  $\mu\text{g Chl.a Eq. L}^{-1}$  (dawn) and 100  $\mu\text{g Chl.a Eq. L}^{-1}$  (day). No differences in metalimnic *P. rubescens* filaments abundances between sampling times were observed from counting (data not shown). Therefore, the slight fluctuations in *P. rubescens* abundance detected by BBE probe were probably linked to variations of *in vivo* fluorescence of Chlorophyll *a* in *P. rubescens* filaments due to different physiological state of the cells over the 24-hours survey (variations between light and dark periods).

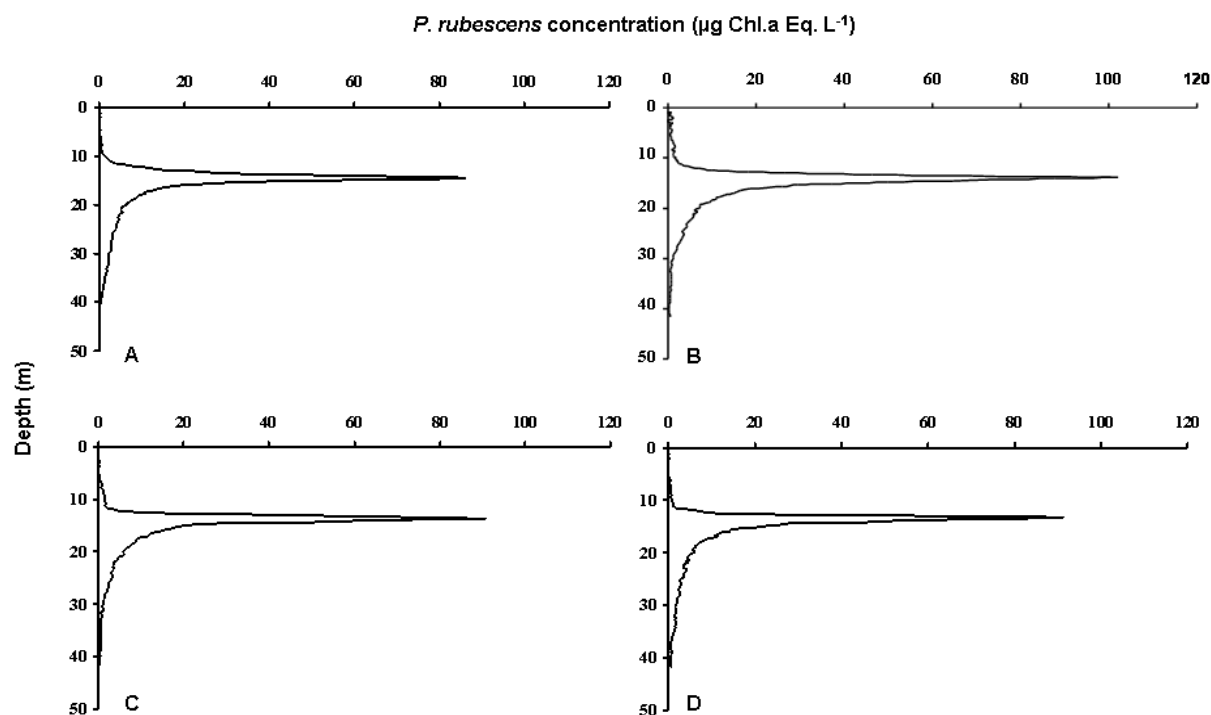


Figure 3: Vertical abundance of *P. rubescens* ( $\mu\text{g Chl.a Eq. L}^{-1}$ ) at dawn (A), midday (B), dusk (C), night (D) in Lake Hallwil in 2011. Black lines correspond to virtual limits between epilimnion (E), metalimnion (M) and hypolimnion (H).

During the circadian cycle, MC-RR and MC-LR were found in seston with MC-RR concentrations significantly higher than MC-LR concentrations ( $p < 0.01$ ). For all sampling times, both MC-RR and MC-LR concentrations were significantly higher ( $p < 0.01$ ) in metalimnion than in epilimnion and hypolimnion. In epilimnion (Fig. 4), MC-LR and MC-RR concentrations were stable through time (with an average concentration of  $0.15 \pm 0.04 \mu\text{g L}^{-1}$  and  $2.0 \pm 0.6 \mu\text{g L}^{-1}$  respectively), apart from the night when no MC-LR was detected. In metalimnion (Fig. 4, Table A1), significant temporal variations both in MC-LR and MC-RR concentrations ( $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively) were detected. Significant differences in MC-RR concentrations were obtained for each pairwise temporal comparisons (Table A1), the values increased from dawn to dusk when maximal concentration was reached ( $14.5 \pm 0.57 \mu\text{g L}^{-1}$ ) and then decreased again at night (Fig. 4). Similarly the maximum mean concentration for MC-LR was also measured at dusk ( $1.5 \pm 0.05 \mu\text{g L}^{-1}$ ) and significant differences were obtained between

## Transfert trophique des microcystines dans les réseaux trophiques pélagiques

sampling times (Table A1). In hypolimnion (Fig. 4), MC-LR was detected only during day, with a concentration of  $0.11 \pm 0.02 \mu\text{g L}^{-1}$ ; while for MC-RR concentrations, a significant difference was observed between dusk and night ( $2.21 \pm 1.1$  and  $0.35 \pm 0.02 \mu\text{g L}^{-1}$  respectively  $p < 0.01$ ).

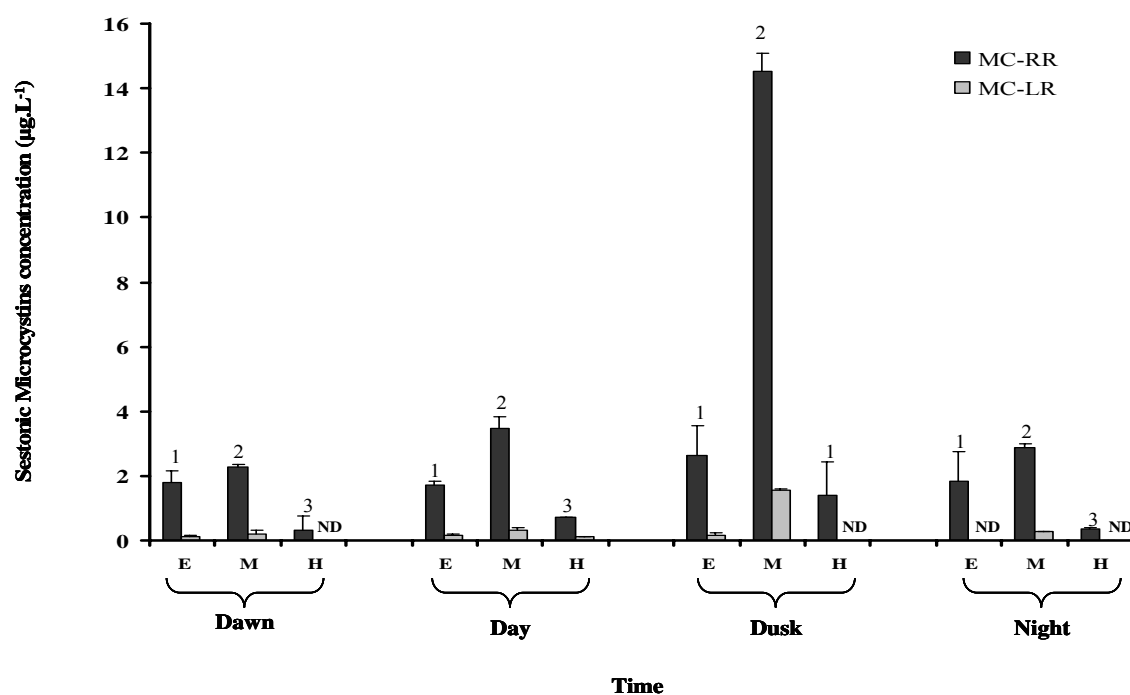


Figure 4: Microcystins (LR and RR) concentrations in epilimnion (E), metalimnion (M) and hypolimnion (H) of Lake Hallwil during a circadian cycle. ND corresponds to Non Detected MC concentrations. For each sampling time, different numbers (1, 2, or 3) correspond to significant differences in MC-RR concentrations between water layers (i.e. for each period of sampling: values with same number are statistically similar, while values with different numbers are significantly different).

MC-LR	MC-RR	Dawn	Day	Dusk	Night
Dawn	-		< 0,0001	< 0,0001	0.006
Day	NS		-	0.006	0.006
Dusk	0.003		NS	-	< 0,0001
Night	NS		NS	0.004	-

Table Additional1: Statistical differences ( $p < 0.01$ ) in sestonic MC-RR and MC-LR concentrations in metalimnion between sampling times. The grey area (right panel) corresponds to the  $p$ -values obtained for the comparison of MC-RR concentrations, the white area (left panel) corresponds to those obtained for MC-LR concentrations. The table presents the  $p$ -values obtained for the nonparametric Kruskal-Wallis test followed by multiple pairwise comparisons using the procedure of Conover-Iman. Each comparison is performed with  $n=3$  samples

Total MCs productivities in metalimnion, where the *P. rubescens* peaks occurred, were calculated

for the different sampling times (Table 1). As for MC-RR concentrations, significant differences in total MCs productivities were observed in metalimnion, with a significant increase ( $p < 0.05$ ) from dawn to dusk, when maximum total MCs productivity reached  $0.67 \pm 0.026 \mu\text{g MCs} \cdot \mu\text{g}^{-1} P. rubescens$ . Then, a significant difference was observed between dusk and night when total MCs productivity decreased to  $0.13 \pm 0.026 \mu\text{g MCs} \cdot \mu\text{g}^{-1} P. rubescens$ .

Total MCs productivity ( $\mu\text{g MC} \cdot \mu\text{g}^{-1} P. rub$ )		Time							
		Dawn		Day		Dusk		Night	
		Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
		0.096	0.0012	0.1508	0.015	0.67	0.026	0.13	0.005
<i>p</i> -values statistics on MCs productivities	Time	Dawn		Day		Dusk		Night	
	Dawn	-		-		-		-	
	Day	0.0006		-		-		-	
	Dusk	< 0.0001		0.013		-		-	
	Night	0.013		NS		0.0006		-	

Table 1: Total microcystins productivity in metalimnion (upper part of the table) and statistical differences ( $p < 0.05$ ) between sampling times (lower part of the table) showing the *p*-values obtained for the nonparametric Kruskal-Wallis test followed by multiple pairwise comparisons using the procedure of Conover-Iman. Each comparison is performed with  $n=3$  values.

## Zooplankton abundances and spatio-temporal distribution

Overall, the zooplanktonic compartment consisted in average of  $47 \pm 5$  % of cyclopids,  $28 \pm 5$  % of *Daphnia*,  $12.2 \pm 2$  % of *Bosmina*,  $11 \pm 1.1$  % of calanids (in terms of abundance) and the rest were mainly *Chaoborus*, *Diaphanosoma*, *Leptodora* and *Bythotrephes*.

Regardless of the sampling period, *Daphnia* were mostly retrieved in both epilimnion and metalimnion, and were rare in the hypolimnion (max 10.4 %). Temporal variations of their relative distribution were observed between epilimnion and metalimnion: at dawn, 36% of the *Daphnia* were retrieved in the epilimnion and 57 % in the metalimnion; while progressively during the day the relative proportions were reversed, and finally, at night, 81 % of the *Daphnia* were found in the epilimnion, and 16% in the metalimnion (Figure 5A). This temporal shift of *Daphnia* spatial distribution between epilimnion and metalimnion was supported by the statistical analyses which showed significant ( $p < 0.01$ ) and concomitant changes in the relative abundance

of *Daphnia* in epilimnion and the metalimnion.

*Bosmina* were mainly retrieved in epilimnion all along the circadian cycle; considering their relative distribution in the water layers, we observed that 66.5%, 96%, 64%, and 72.2% (at dawn, day, dusk and night respectively) of the *Bosmina* were indeed in the epilimnion (Figure 5B). *Bosmina* were also present in significant amount in the metalimnion at dawn and at midday (up to 33.1 % and 27.4% of total *Bosmina*, respectively). The statistical analyses revealed significant temporal difference in these relative distributions, showing a significantly higher *Bosmina* proportion ( $p < 0.01$ ) in metalimnion at dawn and dusk compared to that of the day and night. In hypolimnion, low proportion of *Bosmina* were observed with no significant changes.

From vertical closing net sampling, we found that *Chaoborus* larvae represented on average  $254.7 \text{ ind.m}^{-3}$  in the whole water column during the study ( $0.51 \pm 0.54$  % of total zooplankton abundance). Spatial repartitions of *Chaoborus* larvae during day and night were observed with a hydroacoustic methods usually used in literature (Malinen et al. 2005; Knudsen et al. 2006; Jurvelius et al. 2008). *Chaoborus* larvae were aggregated in upper layers during night and migrated near the bottom (48 m at the station sampled) during day.

## Transfert trophique des microcystines dans les réseaux trophiques pélagiques

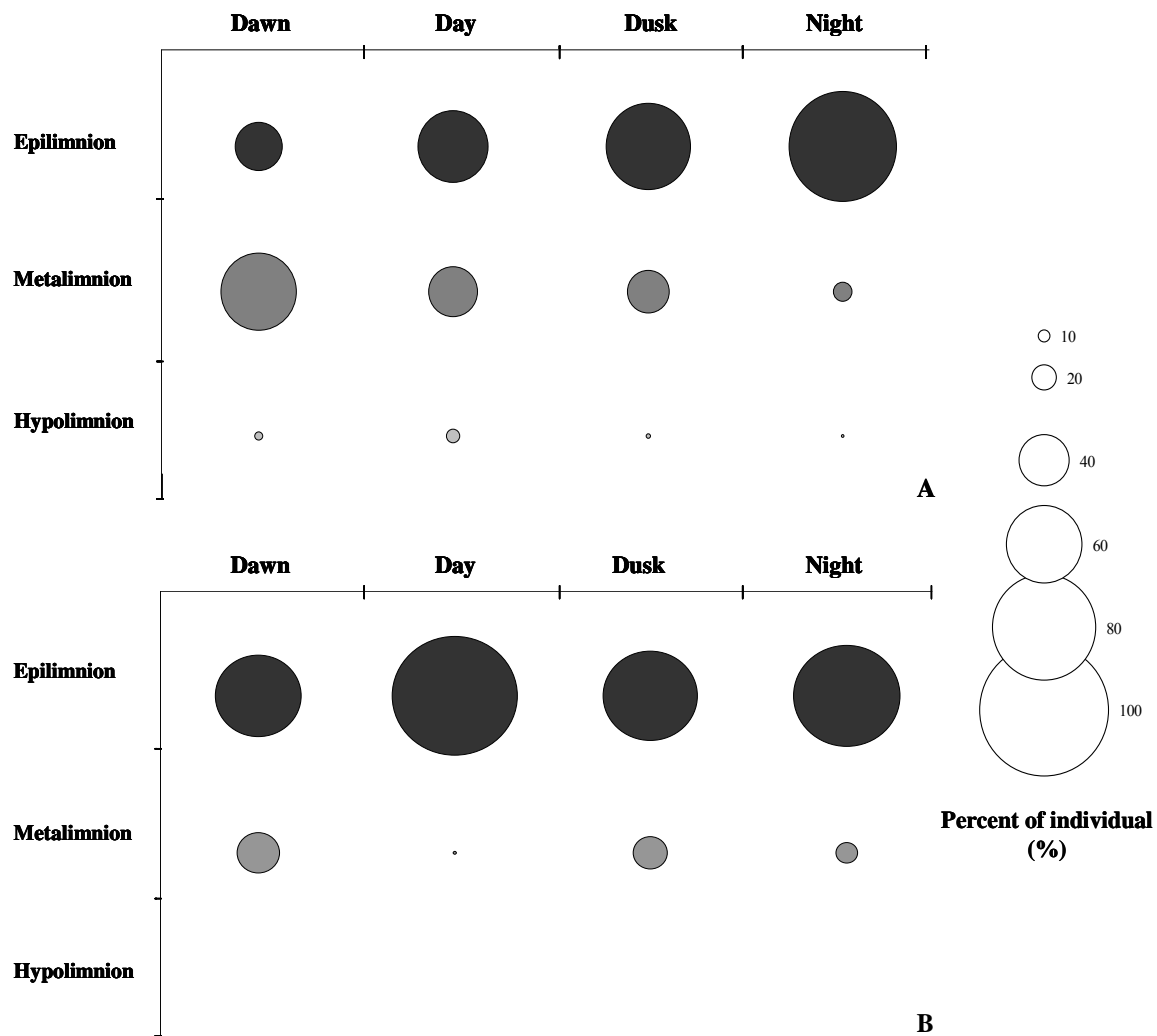


Figure 5: Relative abundances of *Daphnia sp.* (A), *Bosmina sp.* (B) in epilimnion (black), metalimnion (grey) and hypolimnion (light grey) during a circadian cycle. Due to low abundances of *Chaoborus* counts are not shown here.

### Detection of *P. rubescens* DNA in zooplankton diet

DNA originating from *P. rubescens* was detected by qPCR-based methods in 27 out of the 29 *Daphnia* samples and in 3 out of 18 *Bosmina* samples, showing the presence of *P. rubescens* filaments in intestinal contents of these cladocerans. *P. rubescens* gene copies were observed in higher quantities in *Daphnia* compared to that of *Bosmina* and *Chaoborus*. High variability



depending on the sampling period was observed in the quantifications for all zooplanktonic taxa (Table 2). Despite this variability partly due to the digestion processes, the maximum ingestions of *P. rubescens* for both zooplanktonic taxa were clearly observed in the metalimnion, while minimum ingestions were detected in the epilimnion for both zooplanktonic taxa (Table 2).

Water layers	Zooplankton species	<i>P. rubescens</i> ingestion (number of gene copies. organisms <sup>-1</sup> )		
		Min	Max	Mean $\pm$ SD
<b>Epilimnion</b>	<i>Daphnia</i>	ND	1.9	0.7 $\pm$ 0.8
	<i>Bosmina</i>	ND	1.5	0.5 $\pm$ 0.7
	<i>Chaoborus</i>	ND	2.1	0.7 $\pm$ 1.2
<b>Metalimnion</b>	<i>Daphnia</i>	7.6	685	329 $\pm$ 372
	<i>Bosmina</i>	0.4	94	31.8 $\pm$ 54
	<i>Chaoborus</i>	1.3	11	4.9 $\pm$ 5
<b>Hypolimnion</b>	<i>Daphnia</i>	ND	18.8	18.4 $\pm$ 14.7
	<i>Bosmina</i>	NM	NM	NM
	<i>Chaoborus</i>	0.06	0.53	0.14 $\pm$ 0.26

Table 2: *P. rubescens* ingestion by zooplanktonic taxa of lake Hallwil (Number of gene copies.organisms<sup>-1</sup>) revealed by qPCR method, in epilimnion, metalimnion and hypolimnion during a circadian cycle. ND = Undetected gene copies of *P. rubescens* in samples. NM = Unmeasured due to low quantity of zooplankton to constitute samples.

### MC-LR Eq. concentrations in zooplanktonic taxa

MCs were found in *Daphnia*, *Bosmina* and *Chaoborus* larvae with the highest MC-LR Eq. concentrations in both *Daphnia* and *Bosmina* compared to that of *Chaoborus* larvae, regardless of the water layer (Fig 6, Table A2). However, no significant differences were observed between the MCs concentrations measured for both herbivorous cladocerans (Table A2).

The highest MC.LR Eq. concentrations were observed in the metalimnion with maximum concentrations reaching 863  $\pm$  313 and 561  $\pm$  152 ng.g<sup>-1</sup> FW for *Daphnia* and *Bosmina* respectively, and 168 ng.g<sup>-1</sup> FW for one measured sample of *Chaoborus* larvae (Fig. 6B, Table A2). In epilimnion, substantial concentrations were found in each species with maximum MC-LR Eq. concentrations measured at dusk and night of 413  $\pm$  75, 362  $\pm$  132 and 117  $\pm$  68 ng.g<sup>-1</sup>

FW for *Daphnia*, *Bosmina* and *Chaoborus* larvae respectively (Fig 6A). Furthermore in hypolimnion, high concentrations of MCs ( $302 \pm 40 \text{ ng.g}^{-1}$  FW) were detected for *Daphnia* at dawn and dusk (Fig 6C).

In all water layers, temporal variations in MC-LR Eq. concentrations were found in zooplankton taxa with overall significantly high concentrations measured at dusk for herbivorous taxa (*Daphnia* and *Bosmina*)(Fig. 6). No significant evidence appeared regarding the temporal variations of *Chaoborus* larvae intoxication.

## Transfert trophique des microcystines dans les réseaux trophiques pélagiques

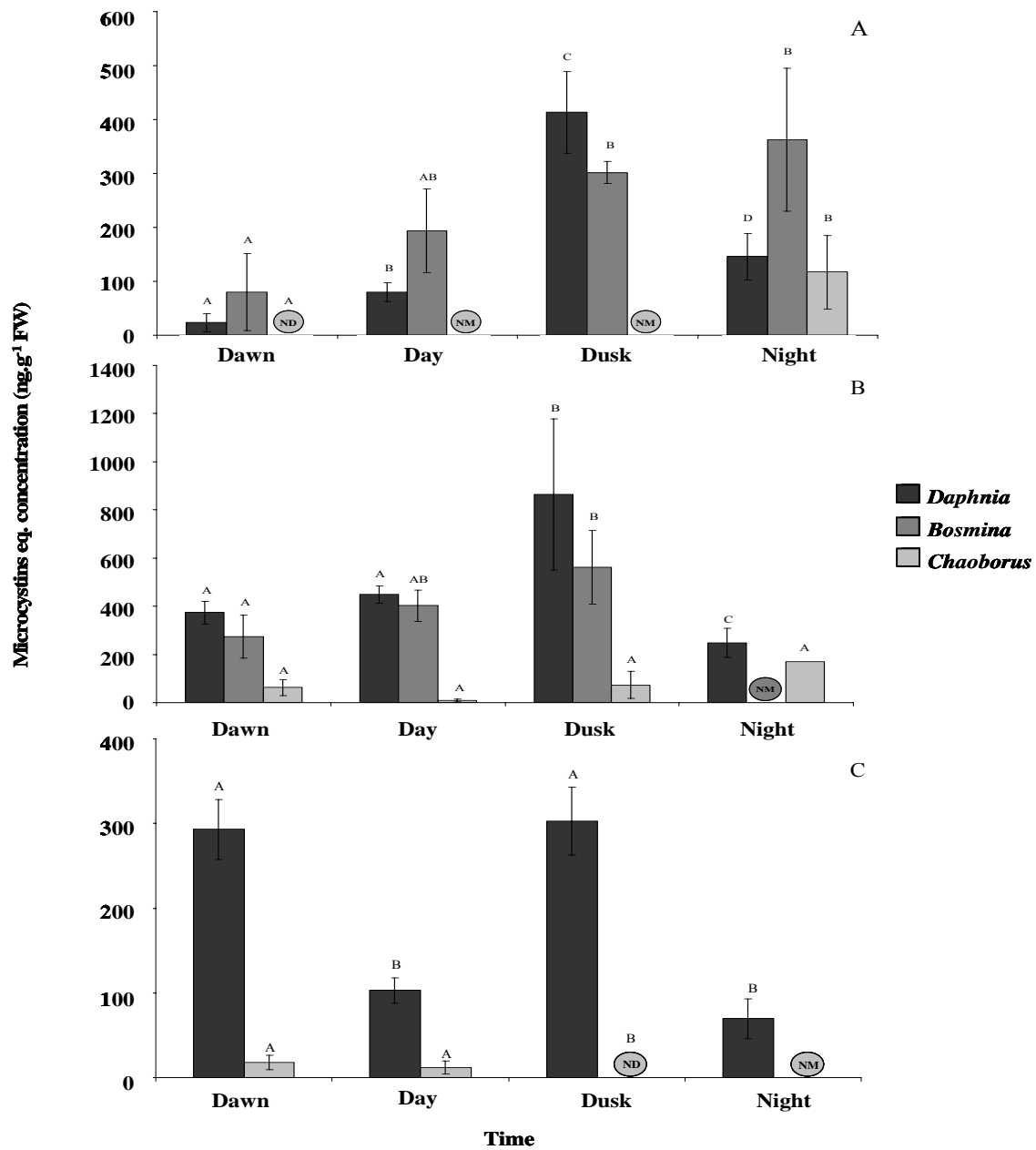


Figure 6: Microcystins equivalent concentration (ng.g<sup>-1</sup> FW) in different zooplanktonic taxa in epilimnion (A), metalimnion (B) and hypolimnion (C) of Lake Hallwil during a circadian cycle. ND = Undetected MCs in samples. NM = Unmeasured MCs due to low quantity of zooplankton. For each species, different letters correspond to significant differences between sampling time.

## Transfert trophique des microcystines dans les réseaux trophiques pélagiques

	Species	<i>Daphnia</i>	<i>Bosmina</i>	<i>Chaoborus</i>
<b>Dawn</b>	<i>Daphnia</i>	-	NS	0.024
	<i>Bosmina</i>	NS	-	0.009
	<i>Chaoborus</i>	0.006	0.03	-
<b>Day</b>	<i>Daphnia</i>	-	0.02	NT
	<i>Bosmina</i>	NS	-	NT
	<i>Chaoborus</i>	0.006	0.03	-
<b>Dusk</b>	<i>Daphnia</i>	-	0.02	NT
	<i>Bosmina</i>	NS	-	NT
	<i>Chaoborus</i>	0.006	0.03	-
<b>Night</b>	<i>Daphnia</i>	-	0.03	NS
	<i>Bosmina</i>	NT	-	0.006
	<i>Chaoborus</i>	NT	NT	-

Table Additional2: Statistical differences in MC-LR Eq. concentrations measured in zooplankton species in epilimnion and metalimnion during circadian cycle. The grey areas (right panels) correspond to the *p*-values obtained for the comparison of MC-LR Eq. concentrations in zooplankton of epilimnion, the white areas (left panels) correspond to those obtained for MC-LR Eq. concentrations in zooplankton of metalimnion. The table presents the *p*-values obtained for the nonparametric Kruskal-Wallis test followed by multiple pairwise comparisons using the procedure of Conover-Iman. NS correspond to no significant differences and NT correspond to not tested. Each comparison is performed with n=3 samples

### ***MC-LR Eq. concentrations brought by fish zooplanktonic preys***

The estimation of total concentrations of MCs accumulated in the classical fish zooplanktonic preys (*Bosmina*, *Daphnia* and *Chaoborus* larvae) present in each water layer (at the different sampling time) were expressed in ng MCs.m<sup>-3</sup>, and were considered as a potential MCs stocks available for trophic transfer up to fish (Fig. 7). The highest values were generally observed in metalimnion, with estimations varying from of 10729 ± 1660 (dawn) and 1094 ± 384 ng MCs.m<sup>-3</sup> (night). In this layer, MC-LR Eq. concentrations transported by fish preys decreased significantly at night (*p* < 0.05) due to vertical movements of zooplanktonic species. During night, MC-LR Eq. concentration measured in epilimnion (4601 ± 483 ng MCs.m<sup>-3</sup>) was significantly higher (*p* < 0.05) than one measured in metalimnion (1094 ± 384 ng MCs.m<sup>-3</sup>) (Fig. 7).

In epilimnion, MC-LR Eq. concentrations varied from 4601 ± 483 to 6922 ± 682 ng MCs.m<sup>-3</sup>, and were significantly higher at dusk and night (*p* < 0.05 (Fig. 7).

MC-LR Eq. concentrations in hypolimnion (from  $930 \pm 114$  to  $70 \pm 21$  ng MCs.m<sup>-3</sup>, values at dawn and night respectively) were significantly lower than those measured in the two other layers ( $p < 0.05$ ) except at dawn when they were similar to those estimated in the epilimnion.

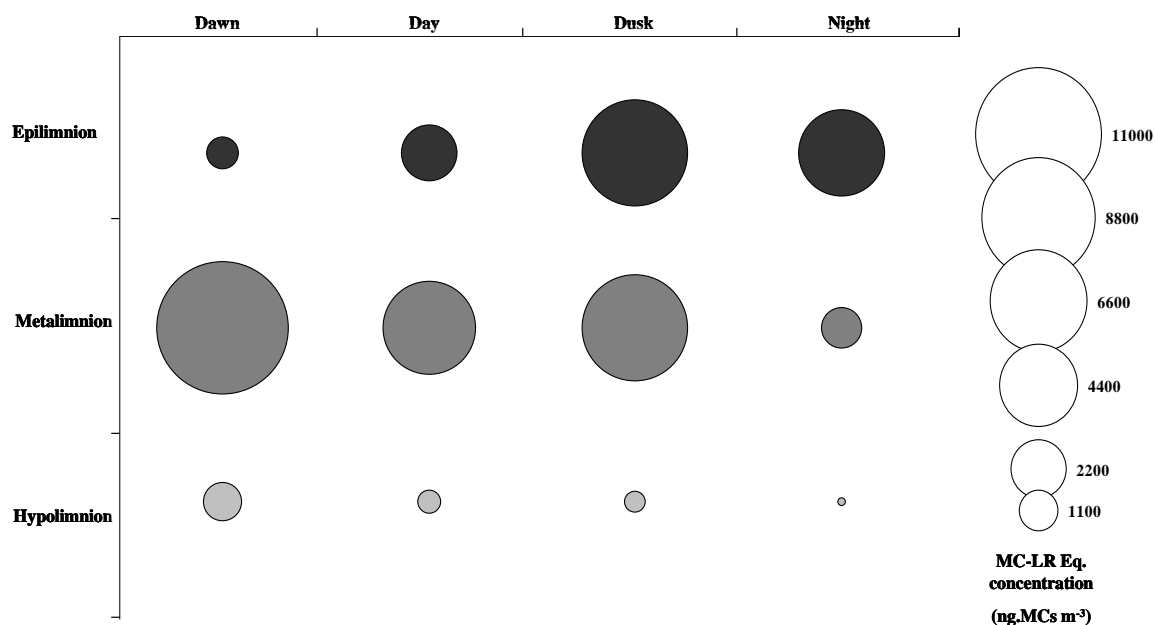


Figure 7: Total MC-LR equivalent concentration (ng.m<sup>-3</sup>) transported by zooplanktonic taxa (*Daphnia*, *Bosmina*, *Chaoborus*) in epilimnion (black), metalimnion (grey) and hypolimnion (light grey) of Lake Hallwil during a circadian cycle. NM = Unmeasured MCs due to low quantity of zooplankton to constitute samples. These estimations are based on the abundance of zooplanktonic taxa in each layers and the amount of toxins found in their body at the various sampling times.

### Presence of MCs in Whitefish

In whitefish, the estimated MCs in gut contents and originating from preys (i.e. *Daphnia*, *Bosmina* and *Chaoborus*) (Table 3) varied widely according to individuals, with estimated concentrations ranging from 24 to 354 MCs.gut content<sup>-1</sup> with an average of  $132.4 \pm 76.5$  ng MCs.gut content<sup>-1</sup>. *Chaoborus* larvae and *Daphnia* represented the mains sources of MCs (respectively and on average, 74.6 %, 20.5 %) (Table 3).

MC-LR Eq. concentrations were found at variable concentrations, ranging from 1.94 to 87.2 ng.g<sup>-1</sup> FW and, from 0.73 to 5.86 ng.g<sup>-1</sup> FW in livers and muscles of whitefish, respectively

## Transfert trophique des microcystines dans les réseaux trophiques pélagiques

(Fig 8). Out of 16 analyzed whitefish, MCs were detected in the livers of 12 fish, and in the muscles of 5 fish. Furthermore, MC-LR Eq. concentrations found in livers were always higher than those measured in muscles (Fig. 8).

	MCs in gut contents (ng MCs. gut content <sup>-1</sup> )			Average part of MCS brought by each zooplanktonic species in gut contents (%)		
	Min	Max	Mean $\pm$ SD	<i>Daphnia</i>	<i>Bosmina</i>	<i>Chaoborus</i>
Whitefish (n=16)	24	354	132.4 $\pm$ 76.5	6	6	85.4
				Mean relative abundance in gut contents		
				Contribution of MCs in gut contents	20.5	4.8
					74.6	

Table 3: Estimation of MCs concentrations in whitefish gut contents and mean contribution of each zooplanktonic taxon in the total MCs concentration estimated for gut contents.

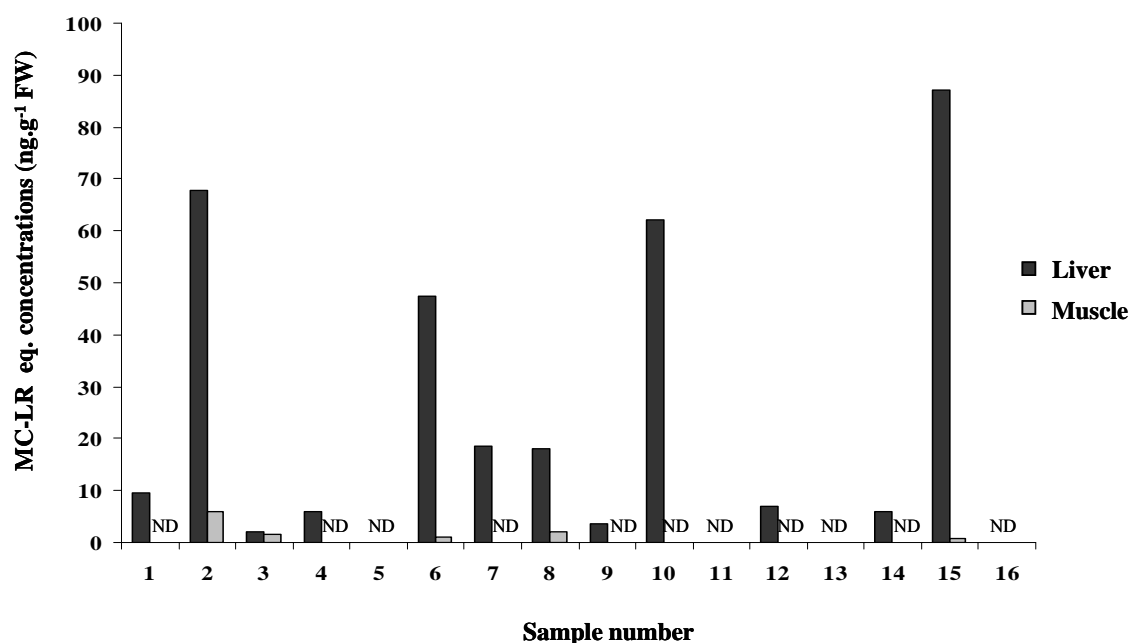


Figure 8: Microcystins equivalent concentrations in liver and muscle of whitefish (n=16) in Lake Hallwil ND = Undetected MCs in samples

## Discussion

### *Planktothrix rubescens* and MCs production in water column

Similarly to other studies (Jacquet et al. 2005; Sotton et al. 2011; Dokulil and Teubner 2012), *P. rubescens* maximum concentrations were found in the metalimnion (between 9 and 12 meters depth). This positioning in the water column is directly linked to a trade-off between its light, phosphorus and turbulence requirements (Dokulil and Teubner 2012). *P. rubescens* is known to regulate its position due to the presence of a buoyant system combining the presence of gas vesicles and the accumulation/degradation of carbohydrates (Walsby 2005).

Both MC-LR and RR were measured in water samples with dominant MC-RR concentrations compared to MC-LR as it has already been observed for *P. rubescens* strains (Briand et al. 2005; Manganelli et al. 2010). The highest MCs concentrations were measured in the metalimnic layer, however MCs were also detected in epilimnion and hypolimnion, due to the presence of some *P. rubescens* filaments in these layers and/or due to the presence of nano-micro- and macro-zooplankton which might have ingested cyanobacteria and then migrated to these layers (Davis and Gobler 2010; Boyer et al. 2011; Davis et al. 2011).

Importantly, the large variations of MC-RR and MC-LR concentrations were noticed depending to sampling period. Indeed, a significant increase in MCs was observed at dusk. This short-term temporal variations of MCs concentrations cannot be explained by an increase in *P. rubescens* filaments abundances (both BBE and microscope data didn't show the differences in *P. rubescens* quantities). Instead, we assume that this increase in MCs concentrations is due to an increase in the total MCs productivity which probably varies with environmental factors and especially light intensity (Tonk et al. 2005). To our knowledge, this is the first time that daily variations of MCs were observed in *in-situ* samples, while such changes have been already



documented in literature under experimental conditions. Wood et al. (2011) showed by measurement of *mcyE* transcriptional gene expression of a *Microcystis* strain, that microcystin synthesis could be significantly up- and down-regulated during of 2–6 h, leading to a 6-fold increase in intracellular MCs content per cell. Several results from experimental approaches support the fact that daily variations of MCs content per cell can exist in *Microcystis* strains (Wiedner et al. 2003; Bittencourt-Oliveira et al. 2005). However, in these studies, the increase of MCs concentrations occurs under increased light conditions, which is not consistent with our result, where maximum MCs concentrations were found at dusk. Unlike *Microcystis* spp., *Planktothrix* species are low-light adapted species which reach maximal growth rates at low irradiances (Bright and Walsby 2000). Generally, MCs production in cyanobacteria can be correlated with growth rates of cyanobacteria (Oh et al. 2000; Long et al. 2001; Wiedner et al. 2003). Therefore, we assume that dusk period could promote the physiological activity of *P. rubescens* and, thus, the MCs production. It was previously described also for a *Planktothrix agardhii* strain which exhibited higher MCs concentrations at low irradiances (Sivonen 1990). Such MCs content variations in *P. rubescens* blooms with maxima at dusk could be important factor in the dynamic of MCs accumulation by zooplankton and fish since zooplankton vertical migration towards the upper water layer and maximum feeding activity of zooplanktivorous fish generally occur at dusk (Mookerji et al. 1998; Probst and Eckmann 2009).

### *Zooplankton community composition*

It is generally believed that cyanobacterial blooms tend to affect the zooplankton community composition by a switch from the large unselective zooplankton, as *Daphnia*, towards small-bodied zooplankton, as copepods and *Bosmina*, which are more selective feeders (Hansson et al. 2007). In our study, copepods were indeed abundant but *Daphnia* were the most numerous

organisms. We assume that the dominance of *Daphnia* populations, able to resist the effects of toxic cyanobacterial bloom, has occurred in this Lake Hallwil. In this lake, frequent *P. rubescens* blooms occur during summer and massive dead patches of *Daphnia* have been observed concomitantly (Baumann and Jüttner 2008). *Daphnia* are able to decrease the size of their filtering apparatus when cyanobacteria are present (Bednarska and Dawidowicz 2007) and to detoxify MCs (Ortiz-Rodríguez and Wiegand 2010; Guo and Xie 2011) in order to limit the ingestion of cyanobacterial cells and to decrease the negative effects of the MCs. Such rapid selection of resistant *Daphnia* clones under the influence of repeated blooms has already been observed before (Hairston et al. 1999). Thus, in Lake Hallwil, such selection of resistant *Daphnia* populations could explain the rather high abundance of *Daphnia* in summer 2011.

#### *Spatial distribution of zooplanktonic taxa*

Zooplankton species are able to perform a diel vertical migrations (DVM) to avoid significant predation pressure by migrating in deeper water layers at dawn and returning at dusk in upper water layers, which are rich in phytoplankton (Masson et al. 2001; Hays 2003). In Lake Hallwil, during this circadian cycle, we did not observe the total vertical migration of *Bosmina* and *Daphnia* since they did not go down to hypolimnion, rather staying in metalimnion. In the Contrary to previous observations (Makino et al. 1996; Masson et al. 2001), their abundances were indeed low in the hypolimnion, regardless of the sampling period. This observation could be relevant to the presence of the cyanobacterial bloom in the metalimnion, which creates visual interference constituting a refuge area beneficial for zooplankton (Engström-Öst et al. 2006). Therefore, zooplankton stays in this water layer, where predation pressure is reduced due to the water turbidity and where food is available (cyanobacteria and microzooplankton), instead of spending energy to go down in the hypolimnion. However, it is also not excluded that *P.*

*rubescens* bloom constitutes a barrier for zooplankton DVM. Indeed, *P. rubescens* filaments could interact with zooplankton organisms making their movements across the metalimnion difficult. Even though the complementary studies are required to confirm these observations on zooplankton movements in Lake Hallwil, we assume that the amplitude of zooplankton DVM can be modified by the presence of dense cyanobacterial blooms.

During the circadian cycle, the major vertical movements of both cladocerans occurred between epilimnion and metalimnion. Indeed, *Daphnia* did not migrate down to hypolimnion, but a DVM of *Daphnia* is observed with an increase in the relative abundance in epilimnion and a concomitant decrease in metalimnion from dawn to night. It is known that *Daphnia* and *Bosmina* exhibit similar DVM patterns during summer (Makino et al. 1996; Lagergren et al. 2008), but in our study, *Bosmina* DVM was not clear. One possible explanation is the distinct predation pressures, exerted on *Bosmina* and *Daphnia*. According to our observations, *Daphnia* were larger than *Bosmina* in Lake Hallwil (personal observation) and were potentially more visible for perch (0+) present in the epilimnion (data not shown). The predation pressure by perch exerted in epilimnion on *Daphnia*, was probably stronger than the pressure exerted on *Bosmina* and could force *Daphnia* to migrate in deeper layers to avoid these visual predators. Differently, *Bosmina* (less affected by perch predation pressure) mostly stays in epilimnion where phytoplankton is diverse, instead of migrating in metalimnion where both toxic cyanobacteria and whitefish are located. Whitefish possesses the gill rakers, enabling it to filtrate efficiently the zooplankton of different sizes, including small zooplankton as *Bosmina* (Bertmar and Strömberg 1969).

The spatio-temporal distribution of *Chaoborus* sp. was difficult to study due to the low number of organisms obtained by our sampling method (vertical net). Generally, *Chaoborus* larvae, which form high densities in the pelagic area, are observed by hydroacoustic survey (Malinen et al. 2005). In this study, hydroacoustic data revealed the presence of a scattering layer,

corresponding to *Chaoborus* larvae, between 10 and 20 meters depth at night, which tends to disappear during the day due to *Chaoborus* larvae migration to deeper water layer as it was reported before (Lagergren et al. 2008).

*P. rubescens* ingestion and MCs accumulation by zooplankton

Results on *P. rubescens* ingestion by the different zooplanktonic taxa provide the evidence for the consumption of *P. rubescens* filaments by zooplankton. *P. rubescens* bloom didn't act as a definite trophic dead end (Perga et al., 2012) and could constitute, notwithstanding its toxicity, a resource for *Daphnia* and *Bosmina*. The quantification *P. rubescens* performed by qPCR assays, has to be considered with caution, since the DNA of *P. rubescens* can be degraded rapidly within the first 30min after ingestion of filaments (decrease up to 10 fold) due to the digestion process (Savitcheva et al., In prep.). In our study, the differences between *P. rubescens* DNA amounts found in zooplankton from metalimnic layer and those found in zooplankton from epilimnic or hypolimnic layers, were significant (on average 35 fold higher both for *Daphnia* and *Bosmina* in metalimnion in comparison to that of epilimnion). Therefore, we assume that maximum *P. rubescens* ingestion mostly occurred in metalimnion for both zooplankton species, leading to MCs accumulation by the ingestion of *P. rubescens* filaments and/or possibly contaminated prey. Moreover, in both zooplankton species, MCs were found during the circadian cycle with maximum concentration in metalimnion and at dusk for all water layers. These results are consistent with the variations in MCs productivity (maximum MCs concentrations in *P. rubescens* measured at dusk).

In our study, MCs concentrations found in *Daphnia* and *Bosmina* were generally in the same range. An accumulation of MCs has already been reported for *Daphnia* (Mohamed 2001; Oberhaus et al. 2007; Martins and Vasconcelos 2009) and for *Bosmina* which seem to be an

efficient accumulator of MCs (Watanabe et al. 1992; Smith and Haney 2006). It's known that cyanobacteria consumption by zooplankton leads to the negative effects on survival, growth rates and fecundity of species (Tillmanns et al. 2008; Martins and Vasconcelos 2009; Han et al. 2012). However, during blooms, the presence of other phytoplanktonic taxa is generally limited, and toxic cyanobacterial cells constitute important carbon resources for zooplankton (de Kluijver et al. 2012), and even can provide specific fatty acids leading to qualitative 'bonus' in the zooplankton diet (Perga et al. 2012). However, the consumption of cyanobacterial cells also leads to MCs accumulation and potentially to the adverse effects on zooplankton population. Furthermore, the microzooplankton, represented by heterotrophic flagellates/ciliates and rotifers, could also constitute an important source of toxins for *Daphnia* and *Bosmina*. Consequently, microzooplankton could represent a way of MCs transfer to *Daphnia* and *Bosmina*; since microzooplankton was shown to actively graze on both toxic and non-toxic strains of cyanobacteria (Davis and Gobler 2010; Boyer et al. 2011; Davis et al. 2011). It is unlikely to know the part of MCs, which was derived from the consumption of *P. rubescens* filaments or from the consumption of microzooplankton containing MCs. Moreover, this problem is not solved with DNA detection of *P. rubescens* gene. It's possible that a part of *P. rubescens* DNA, detected in *Daphnia/Bosmina* diets, is originated from microzooplankton's preys, which had previously ingested *P. rubescens* and were secondly consumed by *Daphnia/Bosmina*.

The presence of MCs in *Chaoborus* larvae even in much lower quantities than measured in their preys, highlights the fact that a trophic transfer of MCs from grazers, as *Bosmina* and *Daphnia*, to their predators (*Chaoborus* larvae) could occur during a cyanobacterial bloom. *Chaoborus* larvae is an important predator of zooplankton in aquatic ecosystems, and it may not intentionally ingest *P. rubescens* filaments (Von Ende and Dempsey 1981; Irvine 1997). Consequently, detection of *P. rubescens* DNA in this zooplankton species could be explained by

the consumption of prey, containing *P. rubescens* DNA. To our knowledge, this is the first study showing that a direct MCs transfer occurs between zooplankton species of different trophic level in the lake environment. The only similar result was observed experimentally with *Daphnia* fed on *Scenedesmus* or a mix of *Scenedesmus* and *Microcystis* and then, given to *Chaoborus* larvae during two days (Laurén-Määttä et al. 1995). The mortality rates of *Chaoborus* larvae were significantly higher with the presence of *Microcystis*, suggesting that *Chaoborus* ingested MCs from their food (*Daphnia*). However, MCs were not detected in *Chaoborus* samples, implying further metabolization and the excretion of this cyanotoxin. In contrast, we hypothesize that, the ingestion of MCs by *Chaoborus* due to a MCs transfer from its zooplanktonic preys, which act as a kind of MCs capsules, occur in Lake Hallwil. It is not surprising that MCs found in *Chaoborus* larvae were lower than those found in *Daphnia/Bosmina* since the MCs tend to biodilute rather than biomagnify in aquatic foodwebs (Ibelings et al. 2005; Kozłowsky-Suzuki et al. 2012)

#### *Transfer of MCs to whitefish*

As, *Chaoborus* larvae, *Bosmina* and *Daphnia* accumulate MCs, they represent vectors of MCs for zooplanktivorous fish, in particular whitefish in Lake Hallwil. Our data suggest that the quantities of MCs transported by these 3 zooplankton species vary according to the water layer, and time period. The highest amounts of MCs, carried by these zooplanktonic taxa were observed in the metalimnic layer at dawn and day. Therefore, whitefish, which are present in metalimnion and upper hypolimnion, were exposed to a ‘trophic contamination’ (by ingesting intoxicated preys), especially during dawn when the fish consume their preys. Furthermore, the presence of whitefish in metalimnion, where water potentially contains the MCs, could lead to an increase of the accumulation level *via* balneation or ingestion of *P. rubescens* filaments (Ernst et al. 2007).

It is noticeable that, at dusk, the MCs concentrations transported by zooplankton in

epilimnion were also rather high (similar to metalimnion or even higher at night). Consequently, our results suggest that, at dusk and night, these taxa might contribute to the intoxication of fish present in epilimnion as percids and cyprinids (Guillard et al. 2006).

The Results of gut content analyses revealed that whitefish was fed primarily on *Chaoborus* larvae. *Chaoborus* larvae performed the DVM (Lagergren et al. 2008), during night, *Chaoborus* larvae were present near the surface, where they theoretically consume zooplankton prey as *Daphnia* and *Bosmina* and, during the day, they spend their time in deep water layers. *Chaoborus* larvae migrated through the metalimnion, and consumed various zooplanktonic preys transporting MCs, and finally contribute to whitefish contamination. Consequently a multiple trophic level contamination (herbivorous, carnivorous invertebrates and zooplanktivorous fish) is possible through trophic transfer. In Lake Hallwil, *Chaoborus* larvae were the main source of MCs for the whitefish during this circadian cycle. *Chaoborus* larvae represented in average 85.4% of the total zooplanktonic abundance in whitefish gut contents and thus representing the main source of MCs originating from fish feeding (74.6% of total MCs estimated from ingested preys). Moreover, *Daphnia* represent an additional source of MCs for whitefish. Indeed, both *Daphnia* and *Bosmina* constituted each, on average, 6 % of the total zooplanktonic abundance in whitefish gut contents. However, *Daphnia*, according to the MCs concentrations found in their body, contributed more particularly to MCs transfer in comparison to *Bosmina* (20.5% of total MCs quantified from analyzed preys came from *Daphnia*). Thus, it's essential to consider both abundance and MCs concentrations in organisms to assess the real importance of each zooplanktonic species in MCs transfer to fish and, consequently, to determine the main vector of the cyanotoxins transfer.

Our results showed that a part of MCs found in liver and muscle of whitefish during this study originates from the consumption of intoxicated zooplankton and especially *Chaoborus*



larvae. However, there is probably other intoxication ways, which could contribute to the accumulation of MCs. Indeed, due to the position of whitefish in the metalimnic and upper hypolimnic layers, *P. rubescens* filaments can be directly ingested by whitefish as it was already observed in the literature (Ernst et al. 2001, 2007; Sotton et al. 2011). This direct ingestion of *P. rubescens* filaments probably occurs accidentally when whitefish consumes the zooplankton. This intoxication way of MCs is considered as minor since, even if few filaments have been observed in fish guts (Sotton et al. 2011), fish tend to avoid the ingestion of cyanobacterial filaments by regurgitation or irregular gaping (Ernst et al. 2006, 2007). Another possible intoxication way for fish, and especially whitefish, present in the metalimnion where *P. rubescens* filaments are located, is the balneation in water which contains dissolved MCs (Trinchet et al. 2011; Pavagadhi et al. 2012). However, MCs are produced and mainly retained within the intact cyanobacterial cells, and are principally released into the surrounding water when cells die and lyse (Chorus and Bartram 1999). Thus, this intoxication way by balneation is probably limited to the early winter when cyanobacterial senescence occurs or during viral or fungus attacks (Park et al. 1998; Briand et al. 2005). It is not excluded that a part of MCs found in whitefish came from a contact with the surrounding water, by drinking water or passive diffusion *via* gill tissue (Carbis et al. 1996; Best et al. 2003). Since no measurements of extracellular MCs were done in Lake Hallwil during our study we can not reject this hypothesis.

### Conclusion

We demonstrated that MCs concentrations found in zooplankton species follow the dynamics of MCs produced by *P. rubescens* cells, especially in grazers that fed on cyanobacterial cells. Our data provide an unequivocal evidence of a trophic transfer of MCs from *P. rubescens* filaments to the whitefish species by the consumption of intoxicated zooplankton, and the

original role of *Chaoborus* in this process is definitely demonstrated by our results. Since our study was based on only one circadian cycle, some results should now be confirmed by repeated observations, especially those regarding the potential modification of the DVM amplitude of the grazers when metalimnic blooms occur but also those regarding the temporal variability in MCs concentrations produced by *P. rubescens*.

Overall, our study shows that whitefish, which are in chronic contact with intoxicated food during the *P. rubescens* bloom, accumulate MCs notably through trophic transfer. Even if this fish is able to detoxify (Sotton et al. 2012), genotoxicity can occur following MCs intoxication (Sotton et al. 2012), and in this chronic conditions of intoxication by MCs, whitefish population could be impacted by the presence of *P. rubescens*

Our data did not allow elucidating the relative importance of trophic transfer and direct balneation in the fish contamination process but they suggest that the complexity of trophic interactions have to be considered for better understanding of fish contamination.

## References

- Babica, P., L. Bláha, and B. Maršálek. 2006. Exploring the natural role of microcystins—A review of effects on photoautotrophic organisms. *J. Phycol.* **42**: 9–20.
- Baumann, H. I., and F. Jüttner. 2008. Inter-annual stability of oligopeptide patterns of *Planktothrix rubescens* blooms and mass mortality of *Daphnia* in Lake Hallwilersee. *Limnologica* **38**: 350–359.
- Bednarska, A., and P. Dawidowicz. 2007. Change in filter-screen morphology and depth selection: Uncoupled responses of *Daphnia* to the presence of filamentous cyanobacteria. *Limnol. Oceanogr.* 2358–2363.
- Bertmar, G., and C. Strömberg. 1969. The feeding mechanisms in plankton eaters I. The epibranchial organs in whitefish. *Mar. Biol.* **3**: 107–109.
- Best, J. H., F. B. Eddy, and G. a. Codd. 2003. Effects of *Microcystis* cells, cell extracts and lipopolysaccharide on drinking and liver function in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* Walbaum. *Aquat. Toxicol.* **64**: 419–426.
- Bittencourt-Oliveira, M. D. C., P. Kujbida, K. H. M. Cardozo, V. M. Carvalho, A. D. N. Moura, P. Colepicolo, and E. Pinto. 2005. A novel rhythm of microcystin biosynthesis is described in the cyanobacterium *Microcystis panniformis* Komárek et al. *Biochem. Bioph. Res. Co.* **326**: 687–94.
- Boyer, J., G. Rollwagen-Bollens, and S. M. Bollens. 2011. Microzooplankton grazing before, during and after a cyanobacterial bloom in Vancouver Lake, Washington, USA. *Aquat. Microb. Ecol.* **64**: 163–174.
- Briand, J. F., S. Jacquet, C. Flinois, C. Avois-Jacquet, C. Maisonnnette, B. Leberre, and J. F. Humbert. 2005. Variations in the microcystin production of *Planktothrix rubescens* (Cyanobacteria) assessed from a four-year survey of Lac du Bourget (France) and from laboratory experiments. *Microbial Ecol.* **50**: 418–428.
- Bright, D. I., and A. E. Walsby. 2000. The daily integral of growth by *Planktothrix rubescens* calculated from growth rate in culture and irradiance in Lake Zürich. *New phytol.* **146**: 301–316.
- Bustin, S. A., V. Benes, J. A. Garson, J. Helleman, J. Huggett, M. Kubista, R. Mueller, T. Nolan, M.W. Pfaffl, G.L. Shipley, J. Vandesompele and C.T. Wittwer. 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* **55**: 611–22.
- Carbis, C., G. Rawlin, G. Mitchell, J. Anderson, and I. McCauley. 1996. The histopathology of carp, *Cyprinus carpio* L, exposed to microcystins by gavage, immersion and intraperitoneal administration. *J. Fish Dis.* **19**: 199–207.

- Chorus, I. ., and Bartram J. 1999. Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management. E&FN Spon, London.
- Davis, T. W., and C. J. Gobler. 2010. Grazing by mesozooplankton and microzooplankton on toxic and non-toxic strains of *Microcystis* in the Transquaking River, a tributary of Chesapeake Bay. *J. Plankton Res.* **33**: 415–430.
- Davis, T. W., F. Koch, M. A. Marcoval, S. W. Wilhelm, and C. J. Gobler. 2011. Mesozooplankton and microzooplankton grazing during cyanobacterial blooms in the western basin of Lake Erie. *Harmful Algae* **15**: 26-35.
- DeVries, D. R., and R. a. Stein. 1992. Complex Interactions between Fish and Zooplankton: Quantifying the Role of an Open-Water Planktivore. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **49**: 1216–1227.
- Dokulil, M. T., and K. Teubner. 2012. Deep living *Planktothrix rubescens* modulated by environmental constraints and climate forcing. *Hydrobiologia* **698**: 29-46.
- Engström-Öst, J., M. Karjalainen, and M. Viitasalo. 2006. Feeding and Refuge Use by Small Fish in the Presence of Cyanobacteria Blooms. *Environ. Biol. Fish.* **76**: 109–117.
- Enz, C. A., H. R. Burgi, F. Stossel, and R. Muller. 2001. Food preference of adult whitefish in eutrophic lake Hallwil ( Switzerland ), and the question of cannibalism. *Arch. Hydrobiol. - Ergebn. Limnol.* **152**: 81–98.
- Ernst, B., L. Dietz, S. J. Hoeger, and D. R. Dietrich. 2005. Recovery of MC-LR in fish liver tissue. *Environ. Toxicol.* **20**: 449–458.
- Ernst, B., B. Hitzfeld, and D. Dietrich. 2001. Presence of *Planktothrix* sp. and cyanobacterial toxins in Lake Ammersee, Germany and their impact on whitefish (*Coregonus lavaretus* L.). *Environ. Toxicol.* **16**: 483–488.
- Ernst, B., S. J. Hoeger, E. O'Brien, and D. R. Dietrich. 2006. Oral toxicity of the microcystin-containing cyanobacterium *Planktothrix rubescens* in European whitefish (*Coregonus lavaretus*). *Aquat.Toxicol.* **79**: 31–40.
- Ernst, B., S. J. Hoeger, E. O'Brien, and D. R. Dietrich. 2007. Physiological stress and pathology in European whitefish (*Coregonus lavaretus*) induced by subchronic exposure to environmentally relevant densities of *Planktothrix rubescens*. *Aquat. Toxicol.* **82**: 15–26.
- Ernst, B., S. Hoeger, E. O'Brien, and D. Dietrich. 2009. Abundance and toxicity of *Planktothrix rubescens* in the pre-alpine Lake Ammersee, Germany. *Harmful Algae* **8**: 329–342.
- Ferrão-Filho, A. da S., and B. Kozlowsky-Suzuki. 2011. Cyanotoxins: bioaccumulation and effects on aquatic animals. *Marine drugs* **9**: 2729–72.

- Guillard, J., M. E. Perga, M. Colon, and N. Angeli. 2006. Hydroacoustic assessment of young-of-year perch, *Perca fluviatilis*, population dynamics in an oligotrophic lake (Lake Annecy, France). *Fisheries Manag. Ecol.* **13**: 319–327.
- Guo, N., and P. Xie. 2011. A study on the effects of food quantity and quality on glutathione S-transferase (GST) activity and growth rate parameters of *Daphnia carinata* varying in age. *Aquatic Ecology* **45**: 63–73.
- Hairston, N. G., W. Lampert, C. E. Cáceres, C. L. Holtmeier, L. . Weider, U. Gaedke, J. M. Fisher, J. A. Fox, and D. M. Post. 1999. Rapid evolution revealed Food contamination by. *Nature* **401**: 446.
- Han, B.-P., X. Lin, L. Lei, and J. Gu. 2012. Survivals of *D. galeata* in sub-tropical reservoirs: harmful effects of toxic cyanobacteria in food source. *Ecotoxicology* **21**: 1692–705.
- Hansson, L. A., S. Gustafsson, K. Rengefors, and L. Bomark. 2007. Cyanobacterial chemical warfare affects zooplankton community composition. *Freshwater Biol.* **52**: 1290–1301.
- Hays, G. C. 2003. A review of the adaptive significance and ecosystem consequences of zooplankton diel vertical migrations. *Hydrobiologia* **503**: 163–170.
- Ibelings, B. W., K. Bruning, J. De Jonge, K. Wolfstein, L. M. . Pires, J. Postma, and T. Burger. 2005. Distribution of microcystins in a lake foodweb: no evidence for biomagnification. *Microbial ecol.* **49**: 487–500.
- Irvine, K. 1997. Food selectivity and diel vertical distribution of *Chaoborus edulis* (Diptera, Chaoboridae) in Lake Malawi. *Freshwater Biol.* **37**: 605–620.
- Jacquet, S., J.-F. Briand, C. Lebourlanger, C. Avois-Jacquet, L. Oberhaus, B. Tassin, B. Vinçon-Leite, G. Paolini, J.-C. Druart, O. Anneville, and J.-F. Humbert. 2005. The proliferation of the toxic cyanobacterium *Planktothrix rubescens* following restoration of the largest natural French lake (Lac du Bourget). *Harmful Algae* **4**: 651–672.
- Jardillier, L., M. V. Zubkov, J. Pearman, and D. J. Scanlan. 2010. Significant CO<sub>2</sub> fixation by small prymnesiophytes in the subtropical and tropical northeast Atlantic Ocean. *ISME J* **4**: 1180–1192.
- Jurvelius, J., F. R. Knudsen, H. Balk, T. J. Marjomäki, H. Peltonen, J. Taskinen, A. Tuomaala, and M. Viljanen. 2008. Echo-sounding can discriminate between fish and macroinvertebrates in fresh water. *Freshwater Biol.* **53**: 912–923.
- de Kluijver, A., J. Yu, M. Houtekamer, J. J. Middelburg, and Z. Liu. 2012. Cyanobacteria as a carbon source for zooplankton in eutrophic Lake Taihu, China, measured by <sup>13</sup>C labeling and fatty acid biomarkers. *Limnol. Oceanogr.* **57**: 1245–1254.

Klüttgen, B., U. Dülmer, M. Engels, and H. . Ratte. 1994. ADaM, an artificial freshwater for the culture of zooplankton. *Water Res.* **28**: 743–746.

Knudsen, F. R., P. Larsson, and P. J. Jakobsen. 2006. Acoustic scattering from a larval insect (*Chaoborus flavicans*) at six echosounder frequencies: Implication for acoustic estimates of fish abundance. *Fish. Res.* **79**: 84–89.

Kotak, B. G., R. . Zurawell, E. E. Prepas, and C. F. B. Holmes. 1996. Microcystin-LR concentration in aquatic food web compartments from lakes of varying trophic status. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **53**: 1974–1985.

Kozlowsky-Suzuki, B., A. E. Wilson, and A. da S. F. Filho. 2012. Biomagnification or biodilution of microcystins in aquatic foodwebs? Meta-analyses of laboratory and field studies. *Harmful Algae* **18**: 47–55.

Lagergren, R., K. Leberfinger, and J. a. E. Stenson. 2008. Seasonal and ontogenetic variation in diel vertical migration of *Chaoborus flavicans* and its effect on depth-selection behavior of other zooplankton. *Limnol. Oceanogr.* **53**: 1083–1092.

Lampert, W. 1997. Zooplankton research : the contribution of limnology to general ecological paradigms. *Aquatic ecology* **31**: 19–27.

Laurén-Määttä, C., J. Hietala, M. Reinikainen, and M. Walls. 1995. Do *Microcystis aeruginosa* toxins accumulate in the foodweb: a laboratory study. *Hydrobiologia* **304**: 23–27.

Lehman, P., S. Teh, G. Boyer, M. Nobriga, E. Bass, and C. Hogle. 2010. Initial impacts of *Microcystis aeruginosa* blooms on the aquatic food web in the San Francisco Estuary. *Hydrobiologia* **637**: 229–248.

Long, B. M., G. J. Jones, and P. T. Orr. 2001. Cellular Microcystin Content in N-Limited *Microcystis aeruginosa* Can Be Predicted from Growth Rate. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 278–283.

Makino, W., H. Haruna, and S. Ban. 1996. Diel vertical migration and feeding rhythm of *Daphnia longispina* and *Bosmina coregoni* in Lake Toya, Hokkaido, Japan. *Hydrobiologia* **337**: 133–143.

Malbrouck, C., and P. Kestemont. 2006. Effects of microcystins on fish. *Environ. Toxicol. Chem.* **25**: 72–86.

Malinen, T., A. Tuomaala, and H. Peltonen. 2005. Hydroacoustic fish stock assessment in the presence of dense aggregations of *Chaoborus* larvae. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **62**: 245–249.

Manganelli, M., S. Scardala, M. Stefanelli, S. Vichi, D. Mattei, S. Bogialli, P. Ceccarelli, E. Corradetti, I. Petrucci, S. Gemma, E. Testai, and E. Funari. 2010. Health risk evaluation

associated to *Planktothrix rubescens*: An integrated approach to design tailored monitoring programs for human exposure to cyanotoxins. *Water Res.* **44**: 1297–1306.

Martins, J., and V. Vasconcelos. 2009. Microcystin Dynamics in Aquatic Organisms. *J. Toxicol. Env. Heal. B* **12**: 65–82.

Masson, S., N. Angeli, J. Guillard, and B. Pinel-Alloul. 2001. Diel vertical and horizontal distribution of crustacean zooplankton and young of the year fish in a sub-alpine lake: an approach based on high frequency sampling. *J. Plankton Res.* **23**: 1041–1060.

McElhiney, J., and L. A. Lawton. 2005. Detection of the cyanobacterial hepatotoxins microcystins. *Toxicol. Appl. Pharm.* **203**: 219–230.

Mehner, T., S. Busch, I. P. Helland, M. Emmrich, and J. Freyhof. 2010. Temperature-related nocturnal vertical segregation of coexisting coregonids. *Ecol. Freshw. Fish* **19**: 408–419.

Metcalf, J. S., K. A. Beattie, S. Pflugmacher, and G. A. Codd. 2000. Immuno crossreactivity and toxicity assessment of conjugation products of the cyanobacterial toxin, microcystin LR. *FEMS Microbiol. Lett.* **189**: 155–158.

Mohamed, Z. A. 2001. Accumulation of Cyanobacterial Hepatotoxins by *Daphnia* in Some Egyptian Irrigation Canals. *Ecotox. Environ. Safe.* **50**: 4–8.

Mookerji, N., C. Heller, H. J. Meng, H. R. Burgi, and R. Muller. 1998. Diel and seasonal patterns of food intake and prey selection by *Coregonus* sp. in re-oligotrophicated Lake Lucerne, Switzerland. *J. Fish Biol.* **52**: 443–457.

Oberhaus, L., M. Gélinas, B. Pinel-Alloul, A. Ghadouani, and J. F. Humbert. 2007. Grazing of two toxic *Planktothrix* species by *Daphnia pulex*: potential for bloom control and transfer of microcystins. *J. Plankton Res.* **29**: 827–838.

Oberholster, P. J., A.-M. Botha, and T. E. Cloete. 2006. Use of molecular markers as indicators for winter zooplankton grazing on toxic benthic cyanobacteria colonies in an urban Colorado lake. *Harmful Algae* **5**: 705–716.

Oh, H., S. J. Lee, M. Jang, and B. Yoon. 2000. Microcystin Production by *Microcystis aeruginosa* in a Phosphorus-limited Chemostat. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 176–179.

Ortiz-Rodríguez, R., and C. Wiegand. 2010. Age related acute effects of microcystin-LR on *Daphnia magna* biotransformation and oxidative stress. *Toxicon* **56**: 1342–1349.

Ostermaier, V., and R. Kurmayer. 2010. Application of Real-Time PCR To Estimate Toxin Production by the Cyanobacterium *Planktothrix* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**: 3495.



O'Neil, J. M., T. W. Davis, M. A. Burford, and C. J. Gobler. 2012. The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change. *Harmful Algae* **14**: 313–334.

Park, H., C. Iwami, M. F. Watanabe, K. Harada, and T. Okino. 1998. Temporal Variabilities of the Concentrations of Intra- and Extracellular Microcystin and Toxic Microcystis Species in a Hypertrophic Lake, Lake Suwa, Japan (1991-1994). *Environ. Toxic. Water* **13**: 61–72.

Pavagadhi, S., Z. Gong, M. P. Hande, D. D. Dionysiou, A. A. de la Cruz, and R. Balasubramanian. 2012. Biochemical response of diverse organs in adult *Danio rerio* (zebrafish) exposed to sub-lethal concentrations of microcystin-LR and microcystin-RR: A balneation study. *Aquat. Toxicol.* **109**: 1–10.

Perga, M.E., I. Domaizon, J. Guillard, V. Hamelet and O. Anneville. 2012. Are cyanobacterial blooms trophic dead-ends?. *Oecologia* In press.

Probst, W. N., and R. Eckmann. 2009. Diet overlap between young of the year perch, *Perca fluviatilis* L., and burbot, *Lota lota* (L.), during early life history stages. *Ecol. Freshw. Fish* **18**: 527–536.

Savichtcheva, O., D. Debroas, R. Kurmayer, C. Villar, J. P. Jenny, F. Arnaud, M. E. Perga, and I. Domaizon. 2011. Quantitative PCR enumeration of total and toxic *Planktothrix rubescens/agardhii* and other cyanobacteria in preserved DNA isolated from lake sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**: 8744-8753.

Sivonen, K. 1990. Effects of light, temperature, nitrate, orthophosphate, and bacteria on growth of and hepatotoxin production by *Oscillatoria agardhii* strains. *Appl. Environ. Microbiol* **56**: 2658–66.

Smith, J., and G. Boyer. 2009. Standardization of microcystin extraction from fish tissues: A novel internal standard as a surrogate for polar and non-polar variants. *Toxicon* **53**: 238–245.

Smith, J. L., and J. F. Haney. 2006. Foodweb transfer, accumulation, and depuration of microcystins, a cyanobacterial toxin, in pumpkinseed sunfish (*Lepomis gibbosus*). *Toxicon* **48**: 580–589.

Smith, V. H., and D. W. Schindler. 2009. Eutrophication science: where do we go from here? *Trends Ecol. Evol.* **24**: 201–7.

Sotton, B., O. Anneville, S. Cadel-Six, I. Domaizon, S. Krys, and J. Guillard. 2011. Spatial match between *Planktothrix rubescens* and whitefish in a mesotrophic peri-alpine lake: Evidence of toxins accumulation. *Harmful Algae* **10**: 749–758.

Sotton, B., A. Devaux, N. Givaudan, J. Guillard, I. Domaizon, S. Bony, and O. Anneville. 2012. Short-term uptake of microcystin-LR by *Coregonus lavaretus*: GST activity and genotoxicity. *Ecotoxicology* **21**: 1788–96.

- Teegarden, G. J., A. D. Cembella, C. L. Capuano, S. H. Barron, and E. G. Durbin. 2003. Phycotoxin accumulation in zooplankton feeding on *Alexandrium fundyense* — vector or sink ?. *J. Plankton Res.* **25**: 429–443.
- Tillmanns, A. R., A. E. Wilson, F. R. Pick, and O. Sarnelle. 2008. Meta-analysis of cyanobacterial effects on zooplankton population growth rate: species-specific responses. *Arch. Hydrobiol.* **171**: 285–295.
- Tonk, L., P. M. Visser, G. Christiansen, E. Dittmann, E. O. F. M. Snelder, C. Wiedner, L. R. Mur, and J. Huisman. 2005. The Microcystin Composition of the *Cyanobacterium Planktothrix agardhii* Changes toward a More Toxic Variant with Increasing Light Intensity. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 5177–5181.
- Trinchet, I., C. Djediat, H. Huet, S. P. Dao, and M. Edery. 2011. Pathological modifications following sub-chronic exposure of medaka fish (*Oryzias latipes*) to microcystin-LR. *Reprod. Toxicol.* **32**: 329–40.
- Van Apeldoorn, M. E., H. P. Van Egmond, G. J. A. Speijers, and G. J. I. Bakker. 2007. Toxins of cyanobacteria. *Mole. Nutr. Food Res.* **51**: 7–60.
- Von Ende, C., and D. O. Dempsey. 1981. Apparent exclusion of the Cladoceran *Bosmina longirostris* by invertebrate predator *Chaoborus americanus*. *Am. Mid. Nat.* **105**: 240–248.
- Walsby, A. E. 2005. Stratification by cyanobacteria in lakes: a dynamic buoyancy model indicates size limitations met by *Planktothrix rubescens* filaments. *New Phytol.* **168**: 365–376.
- Watanabe, M. M., K. Kaya, and N. Takamura. 1992. Fate of the toxic cyclic hepatpeptides, the Microcystins, from blooms of *Microcystis* (Cyanobacteria) in a hypertrophic lake. *J. Phycol.* **28**: 761–767.
- Wiedner, C., P. M. Visser, J. Fastner, J. S. Metcalf, G. A. Codd, and L. R. Mur. 2003. Effects of Light on the Microcystin Content of *Microcystis* strain PCC 7806. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 1475–1481.
- Wiegand, C., and S. Pflugmacher. 2005. Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **203**: 201–218.
- Wilson, A. E., O. Sarnelle, and A. R. Tillmanns. 2006. Effects of cyanobacterial toxicity and morphology on the population growth of freshwater zooplankton: Meta-analyses of laboratory experiments. *Limnol. Oceanogr.* **51**: 1915–1924.
- Wood, S. A., L. R. Briggs, J. Sprosen, J. G. Ruck, R. G. Wear, P. T. Holland, and M. Bloxham. 2006. Changes in concentrations of microcystins in rainbow trout, freshwater mussels, and cyanobacteria in Lakes Rotoiti and Rotoehu. *Environ. Toxicol.* **21**: 205–22.

Wood, S. A., A. Rueckert, D. P. Hamilton, S. C. Cary, and D. R. Dietrich. 2011. Switching toxin production on and off: intermittent microcystin synthesis in a *Microcystis* bloom. *Environ. Microbiol. Rep.***3**: 118–124.

## 6 Discussion générale

Malgré la diminution de la charge en phosphore, la présence récurrente de fortes biomasses de *Planktothrix rubescens* a pu être observée au cours de ces dernières années sur le lac d'Hallwil et également sur le lac du Bourget (jusqu'en 2009). Cependant, les concentrations en *P. rubescens* mesurées sur le terrain diffèrent entre les deux lacs. En effet sur le lac du Bourget, les concentrations maximum en *P. rubescens* mesurées au cours de l'été 2009 atteignaient 30 µg eq. Chl.a L<sup>-1</sup> alors que sur le lac d'Hallwil, les valeurs maximum observées au cours de l'été 2011 atteignaient 100 µg eq. Chl.a L<sup>-1</sup>. Il est admis dans la littérature que le développement des efflorescences de *P. rubescens* est directement affecté par divers paramètres abiotiques et notamment les concentrations en phosphore (Dokulil et Teubner, 2012). Depuis longtemps *P. rubescens* est décrite comme une espèce adaptée aux systèmes stratifiés et caractérisés par des concentrations en phosphore modérées comme c'est le cas pour les lacs du Bourget et d'Hallwil considérés respectivement comme oligo-mésotrophe et méso-eutrophe (Jacquet et al., 2010; Ostermaier et Kurmayer, 2010). Au cours de ce travail, les impacts de la présence des blooms de *P. rubescens* ainsi que les voies de transfert des MCs ont été étudiés sur deux modèles piscicoles se distinguant principalement par leurs positions verticales dans la masse d'eau. Conformément à leurs préférences thermiques, les juvéniles de perche sont présents dans l'épilimnion et n'entrent donc *a priori* pas en contact direct avec les filaments de la cyanobactérie, contrairement aux corégones qui, de part leur présence dans le métalimnion et l'hypolimnion supérieur, sont en contact récurrents avec les filaments de *P. rubescens* et la couche d'eau métalimnique contenant potentiellement des MCs. Ces répartitions spatiales distinctes impliquent donc des voies et des intensités de contamination potentiellement différentes qui peuvent expliquer des impacts variables des blooms et des MCs sur ces deux espèces de poissons.

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons souhaité plus particulièrement contribuer à la compréhension des différentes interactions qui existent entre les cyanobactéries, les organismes zooplanctoniques et l'ichtyofaune au cours des blooms de *P. rubescens*, et notamment des interactions trophiques expliquant les transferts de toxines et certains aspects plus physiologiques en lien avec les cinétiques de contamination et détoxifications chez les poissons étudiés. Par ailleurs l'objectif était également d'aborder les questions de transferts trophiques par des approches écosystémiques afin de tenir compte le plus possible des conditions écologiques 'in

*situ*'. Le bilan de ce travail tient donc compte à la fois des observations écosystémiques, et des informations acquises par les approches expérimentales qui contribuent à l'interprétation des données de terrain. La discussion générale présentée ci après s'articule autour de 5 volets visant à apporter un éclairage sur les voies de contamination jusqu'aux poissons et la variabilité spatio-temporelle qui doit être prise en compte dans la compréhension de ces processus de contamination. C'est ainsi que les paragraphes suivants traiteront successivement :

1. Des connaissances acquises concernant l'utilisation de *P. rubescens* comme ressource alimentaire par les organismes zooplanctoniques brouteurs, et le transfert des MCs au sein des réseaux trophiques planctoniques.
2. Des facteurs impliqués dans les variations temporelles des transferts toxines jusqu'au poisson : prise en compte de dynamiques saisonnières et rythmes journaliers.
3. De l'importance des habitudes de vie des espèces piscicoles et des processus physiologiques de détoxifications dans la compréhension des niveaux de contamination par les MCs.
4. Des autres voies potentielles de contamination des poissons par les MCs au cours d'un bloom de *P. rubescens*.
5. De l'estimation des impacts et des risques des contaminations aux MCs pour les organismes piscicoles : limites des données acquises au cours de ce travail et perspectives.

## **6.1 Le compartiment zooplanctonique comme vecteur de toxines : ingestion et transfert trophique des MCs**

Le compartiment zooplanctonique constitue une ressource indispensable pour de nombreuses espèces piscicoles mais peut également constituer un compartiment vecteur de nombreux xénobiotiques. Lorsque les blooms sont présents dans les écosystèmes, d'importants changements dans la composition spécifique du compartiment zooplanctonique s'opèrent avec notamment une diminution d'abondance des espèces de grandes tailles, telles que les daphnies dont l'alimentation est peu sélective, au profit d'espèces de petites tailles, telles que les bosmines et les copépodes, plus sélectives vis-à-vis des particules ingérées (Ghadouani et al., 2003; Hansson et al., 2007; Yang et al., 2012). Dans le lac d'Hallwil par exemple, la littérature rapporte déjà d'importantes

mortalités de daphnies, observables en surface, lors d'un bloom de *P. rubescens* (Baumann et Jüttner, 2008). Cependant, dans notre étude, la forte présence de *Daphnia*, à la fois dans les deux lacs et dans les contenus stomacaux des poissons, pondère les résultats obtenus par Baumann et Jüttner (2008). En effet, les daphnies représentaient une part plus importante du zooplancton total que les bosmines. Les changements drastiques de composition spécifique du zooplancton ainsi que les fortes mortalités observés par certains auteurs à la suite des blooms ne semblent donc pas inéluctables. La plasticité phénotypique des daphnies conjointement à la sélection des clones résistants sous l'effet des blooms récurrents de cyanobactéries jouent un rôle important dans les phénomènes d'adaptation et de résistance des cladocères aux cyanobactéries, et pourraient ainsi expliquer leur forte présence en terme d'abondance dans les deux lacs (Hairston et al., 1999; Gustafsson et Hansson, 2004; Guo et Xie, 2006; Bednarska et Dawidowicz, 2007). Par ailleurs, une étude réalisée avec des daphnies issues d'un lac ayant connu des blooms récurrents de cyanobactéries montrent qu'en présence de *P. rubescens*, les daphnies sont capables d'ingérer des filaments de la cyanobactérie, préférentiellement ceux de petites tailles et d'accumuler les MCs (Oberhaus et al., 2007). Ainsi en s'adaptant à la présence des filaments de *P. rubescens* au cours des blooms, les populations de daphnies ont probablement acquis la capacité de faire face aux contraintes de taille et de toxicité que la consommation de cyanobactérie représente, et en conséquence, ces cladocères constituent des vecteurs potentiels des toxines pour les compartiments trophiques supérieurs. Au cours de ce travail, nous avons effectivement pu mettre en évidence la présence d'ADN cyanobactérien et de toxines dans le zooplancton et notamment dans les daphnies, les bosmines et dans des larves de *Chaoborus*, prédatrices du zooplancton brouteur. Les concentrations en MCs mesurées dans les daphnies et les bosmines atteignaient des valeurs globalement similaires suggérant pour ces deux genres, un rôle en tant que vecteurs potentiels des MCs au sein des réseaux trophiques touchés par la présence de *P. rubescens*. Dans la littérature, les daphnies et les bosmines ont déjà été rapportés comme étant d'importants « accumulateurs » de MCs lors des blooms de cyanobactéries (Watanabe et al., 1992; Mohamed, 2001; Smith et Haney, 2006; Martins et Vasconcelos, 2009). Toutefois il est admis que les cyanobactéries constituent une nourriture de qualité médiocre pour le zooplancton entraînant des effets négatifs sur la survie, la croissance et la fécondité des espèces (Wilson et al., 2006; Tillmanns et al., 2008; Martins et Vasconcelos, 2009). Cependant, en période de bloom, l'exclusion compétitive des autres taxons phytoplanctoniques par les cyanobactéries entraîne une

diminution globale de la diversité et de la qualité de la ressource présente dans les écosystèmes. Et, en dépit de leur toxicité, les cellules de cyanobactéries peuvent donc constituer une ressource d'énergie importante pour le zooplancton (de Kluijver et al., 2012). Plusieurs études expérimentales ont mis en avant le fait que la consommation de *P. rubescens* pouvaient être plus favorable aux daphnies que le jeûne et que les taux de filtrations pouvait être aussi élevés voire plus que pour des cryptophycées pourtant considérées comme une ressource alimentaire de très bonne qualité (Brett et Müller-Navarra, 1997). Par ailleurs, une étude récente (basée sur une approche écosystémique) réalisée sur le lac du Bourget met en avant le fait que *P. rubescens* peut constituer une source d'acides gras polyinsaturés essentiels, et notamment de 18:3 $\omega$ 3, pour le zooplancton qui utilise effectivement *in situ* la ressource cyanobactérienne (Perga et al., 2012). Ainsi, si la présence du bloom de *P. rubescens* conduit à sélectionner les populations les plus résistantes de daphnies et de bosmines, il est possible que l'ingestion de *P. rubescens* soit suffisante pour que les bénéfices (apports énergétiques notamment) apportés *via* la consommation de *P. rubescens* soient supérieurs aux effets négatifs, induits par la contamination aux MCs ; et, ceci d'autant plus que les effets négatifs des MCs peuvent être limités par la capacité de détoxification du zooplancton (Ortiz-Rodríguez et Wiegand, 2010). Les analyses ADN des contenus intestinaux réalisées sur les daphnies et les bosmines montrent que les daphnies consomment *in-situ* les filaments de *P. rubescens* et ceci en plus grande quantité dans le métalimnion que dans l'épilimnion et l'hypolimnion (même si l'aspect quantitatif de ces mesures est à prendre avec une grande précaution). De plus, les concentrations en MCs mesurées dans le zooplancton épilimnique et métalimnique suivent les variations de concentrations en MCs mesurées dans le seston au cours du cycle nycthéral. Ces résultats confirment qu'en période de bloom, les filaments de *P. rubescens* constituent une part significative de l'alimentation des cladocères brouteurs et que les daphnies et les bosmines consomment les filaments de *P. rubescens* et accumulent les MCs principalement dans le métalimnion. Cependant, il est difficile de quantifier la part réelle que constitue l'ingestion des filaments de *P. rubescens* pour les brouteurs. En effet, la digestion intestinale affecte rapidement l'intégrité de l'ADN de *P. rubescens* et ainsi son signal qPCR, rendant la quantification, juste et reproductible, extrêmement difficile. De plus, il est possible qu'une part des copies de gènes de *P. rubescens* détectée au cours des analyses biomoléculaires réalisées sur les daphnies et les bosmines provienne de filaments de *P. rubescens* préalablement consommés par d'autres organismes, comme par

exemple ceux constituant le micro-zooplankton qui à leur tour ont été consommés par les brouteurs. Le micro-zooplankton, représenté notamment par les flagellés et ciliés hétérotrophes ainsi que par les rotifères, est en effet capable de brouter activement des souches toxiques de cyanobactéries filamenteuses (Davis et Gobler, 2010; Boyer et al., 2011; Davis et al., 2011). On est en droit d'imaginer que si le micro-zooplankton consomme des filaments de *P. rubescens*, il peut également accumuler les MCs et les transférer aux daphnies et aux bosmines et ainsi constituer une voie d'accumulation des MCs pour le zooplankton brouteur. Concernant les prédateurs invertébrés, l'accumulation des MCs par les larves de *Chaoborus* dans notre cas suggère un transfert des MCs *via* ses proies zooplanctoniques. Les larves de *Chaoborus* se nourrissent de différentes proies au cours de leur développement et notamment de rotifères, de cladocères et de copépodes (Swift, 1992). L'ingestion intentionnelle de filaments de *P. rubescens* par cet organisme est donc peu probable et limitée à l'ingestion de quelques filaments lors de la consommation de ses proies zooplanctoniques. Ainsi, l'ADN de *P. rubescens* détecté dans les larves de *Chaoborus* provient probablement des proies consommées par cette espèce. L'ingestion des proies ayant consommé *P. rubescens* plutôt que l'ingestion directe de filaments de *P. rubescens* peut expliquer les plus faibles concentrations en MCs retrouvées dans les larves de *Chaoborus* comparativement aux espèces herbivores. En effet, dans les réseaux trophiques, les MCs ont tendance à se « biodiluer » (Ibelings et al., 2005; Kozłowsky-Suzuki et al., 2012), c'est-à-dire que les concentrations en MCs diminuent avec l'augmentation de la position trophique des organismes. En revanche, à l'échelle des organismes, même si les concentrations accumulées sont faibles (quand elles sont rapportées à la biomasse des individus), des dommages physiologiques ou histologiques peuvent tout de même être observés, et des organes particuliers peuvent présenter de fortes teneurs en MCs. Ainsi, les larves de *Chaoborus* qui se situent à un niveau trophique au dessus des bosmines et des daphnies présentent des teneurs en toxines (exprimées par poids frais d'individu) plus faibles que ces deux espèces brouteuses car leur alimentation est moins chargée en toxines que celle des daphnies et des bosmines qui se nourrissent, au moins en partie, directement de filaments de cyanobactéries (dans notre cas d'étude en tous cas). A notre connaissance, c'est la première fois qu'un transfert des MCs entre des organismes zooplanctoniques de niveaux trophiques différents est observé en conditions environnementales. Seul Laurén-Määttä et al. (1995) ont pu soupçonner expérimentalement la présence d'un transfert des MCs des daphnies aux larves de *Chaoborus* en observant de plus forts taux de mortalité pour



des larves nourries avec des daphnies pré-exposées aux cyanobactéries que pour des larves nourries avec des daphnies contrôles. Cependant, la présence de MCs n'avait pu être détectée au cours de cette expérience, ce qui laisse penser que dans ces conditions expérimentales, la toxine avait été métabolisée et excrétée par les larves de *Chaoborus*.

Ainsi, le compartiment zooplanctonique, en consommant des filaments de *P. rubescens* ou du zooplancton contaminé, constitue un compartiment vecteur de MCs pour les poissons. Outre le régime alimentaire des poissons (qui sera discutée § 6.3), l'importance de ce transfert de MCs par les organismes zooplanctoniques jusqu'aux poissons est dépendante de la position trophique des organismes zooplanctoniques mais également des changements qui s'opèrent, tant à l'échelle saisonnière que journalière dans les concentrations en MCs produites par *P. rubescens*, les abondances des différentes espèces zooplanctoniques et leurs positions dans la colonne d'eau.

## **6.2 Facteurs impliqués dans la variabilité temporelle des transferts de toxines par le zooplancton**

### **6.1.1 Variabilité des transferts de MCs à l'échelle saisonnière**

A l'échelle saisonnière, l'efficacité du transfert des MCs au sein des réseaux trophiques est dépendante à la fois des concentrations en *P. rubescens* et en MCs produites mais également des changements de structure/organisation des communautés planctoniques (diversité, abondances et distribution spatiale des espèces zooplanctoniques). Les résultats obtenus sur le lac du Bourget montrent que les plus fortes concentrations en *P. rubescens* et en MCs sont présentes au mois d'août. Par la suite, au cours du mois de septembre, les concentrations en *P. rubescens* n'évoluent pas mais en revanche celles en MCs diminuent de près de la moitié. Parallèlement à cela, des changements spécifiques dans la composition de la communauté zooplanctonique s'opèrent à ces mêmes périodes. Au cours du mois d'août, les daphnies dominent la communauté zooplanctonique puis, au cours du mois de septembre, leur abondance diminue progressivement au profit de celle des bosmines qui deviennent alors dominantes (Jacquet et al., 2009). Le mois de septembre est également marqué par une augmentation des abondances de cladocères prédateurs tels que *Leptodora* où *Bythotrephes* (Jacquet et al., 2009), qui dans le réseau trophique du lac du

Bourget, jouent probablement un rôle similaire dans le transfert des MCs à celui des larves de *Chaoborus* observées dans le lac d'Hallwil. Comme discuté précédemment, les daphnies et les bosmines, en ingérant les filaments de *P. rubescens* directement, peuvent constituer de meilleurs vecteurs de MCs (en termes de quantité de toxines transportées par individu) dans les réseaux trophiques que les *Leptodora* et les *Bythotrephes* qui sont leurs prédateurs et qui transportent de plus faibles quantités de toxines. Ces changements de concentrations en *P. rubescens* et en MCs ainsi que ces changements de composition spécifique du compartiment zooplanctonique peuvent notamment expliquer des variations temporelles dans les niveaux de contamination des poissons. Ainsi, c'est au mois d'août, lorsque les daphnies dominent et que les plus fortes concentrations en MCs sont mesurées dans le seston, que le transfert et la contamination des espèces de poissons par les MCs sont maxima (§ 4.1 et 5.1). En revanche, au mois de septembre les quantités de MCs transférées aux poissons s'amenuisent limitant ainsi la contamination des poissons. En effet au cours de ce mois, les bosmines, bien que pouvant être considérées comme vecteur important des MCs sur la base des données acquises sur le lac d'Hallwil, sont des filtreurs moins efficaces que les daphnies, et doivent donc transporter des quantités de MCs moindres (en comparaison des daphnies au cours du mois d'août). De plus, les bosmines sont des cladocères de plus petites tailles, moins visibles que les daphnies pour les poissons, et donc généralement moins efficacement consommés ; les poissons planctonophages préférant des proies moins difficiles à capturer telles que les *Leptodora* et les *Bythotrephes* qui elles contiennent des concentrations en MCs plus faibles que les bosmines. Les paramètres évoqués ci avant sont des facteurs explicatifs des dynamiques saisonnières qui peuvent exister dans la contamination des poissons (concentrations en MCs, structure de la communauté zooplanctonique impliquée dans l'efficacité du transfert trophique), toutefois, des variabilités à beaucoup plus court terme peuvent également exister, notamment en lien avec la production en toxines par les cyanobactéries et les déplacements verticaux du zooplancton.

### 6.1.2 Variabilité des transferts de MCs à l'échelle journalière

Dans les deux lacs étudiés, la présence de MCs et principalement des variants RR et LR, a été observée conjointement à la présence du bloom de *P. rubescens*. Il est reporté dans la littérature que *P. rubescens* est une cyanobactérie productrice de nombreux métabolites secondaires

toxiques et principalement des variants RR et LR de la microcystine (Jann-Para et al., 2004; Messineo et al., 2006; Paulino et al., 2009). D'après nos résultats, il semblerait qu'il existe une relation linéaire entre les abondances de *P. rubescens* et les concentrations en MCs mesurées. Cependant, l'observation de concentrations différentes en MCs pour des abondances identiques de *P. rubescens* suggère que la quantité de filaments de *P. rubescens* n'est pas le seul facteur explicatif des concentrations en MCs. En effet, la production de microcystine par les cyanobactéries peut être influencée par différents facteurs, tels que le taux de croissance de la cyanobactérie, la présence de zooplancton et de poisson, les concentrations en nutriments, la température ou encore la lumière (e.g. Oh et al., 2000; Jang et al., 2004, 2008; Wood et al., 2011). De plus, comme il a déjà été mis en évidence dans de nombreux lacs péri-alpins (Ostermaier et Kurmayer, 2009, 2010), cette variabilité peut également être expliquée par la présence de souches non toxiques de *P. rubescens* incapables de produire des MCs. Ainsi en fonction des stations d'échantillonnage, l'influence variable des différents facteurs affectant la production de MCs et les proportions en souches toxiques/non toxiques pourraient expliquer ces variations de concentrations en MCs observées notamment au cours de notre étude. À l'échelle journalière, la variabilité des concentrations en MCs mesurées pour des abondances identiques de *P. rubescens* pourrait induire des différences à la fois dans l'importance du transfert de MCs par les organismes zooplanctoniques et *in fine* dans la contamination des poissons. Notre travail a également permis de mettre en avant le fait que les concentrations en MCs mesurées au cours du cycle nycthéral peuvent varier de manière importante et ceci indépendamment des concentrations en *P. rubescens* qui, elles, sont restées similaires au cours de l'étude. A notre connaissance, c'est la première fois qu'un tel phénomène est observé en conditions environnementales. Cependant, d'autres auteurs ont mis en évidence expérimentalement pour des souches de *Microcystis*, une cyanobactérie productrice de MCs et responsable de blooms de surface, des variations positives et négatives rapides (visibles en 24 heures) de la concentration et du nombre d'ARN messagers transcrits des MCs, produits par cellule (Wiedner et al., 2003; Bittencourt-Oliveira et al., 2005; Wood et al., 2011). Dans notre étude, c'est au cours du crépuscule que les plus fortes valeurs de MCs (LR et RR) ont été mesurées dans le métalimnion, période pendant laquelle les organismes zooplanctoniques migrent et la plupart des poissons, dont les juvéniles de perche et les corégones, se nourrissent (Becker et Eckmann, 1992; Wang et Eckmann, 1994; Hays, 2003; Probst et Eckmann, 2009). Il n'est pas rare de voir dans la

littérature que les niveaux de contamination des réseaux trophiques augmentent au cours de la saison parallèlement à l'augmentation des concentrations en cyanobactéries présentes dans les milieux (Magalhães et al., 2003; Wood et al., 2006; Zhang et al., 2009). Nos observations quant à elles suggèrent qu'il peut exister également des rythmes de contamination variables du zooplancton et par conséquent des poissons à des échelles de temps courtes (par exemple à l'échelle journalière); toutefois, ces observations relatives aux variations à court terme nécessitent d'être vérifiées par des études complémentaires afin de pouvoir asseoir les résultats obtenus lors d'un seul cycle nycthéral.

De plus, au cours des cycles nycthéraux, le zooplancton réalise des migrations verticales dans la colonne d'eau afin d'éviter la pression de prédation exercée par les poissons zooplanctonophages. Ce phénomène se traduit généralement par une forte abondance de zooplancton dans les couches profondes des lacs durant la journée et à l'inverse, de fortes abondances dans les couches de surface la nuit (Hays, 2003). Cependant, dans le lac d'Hallwil, la faible présence des daphnies et des bosmines dans l'hypolimnion, où elles sont observées généralement durant la journée (Makino et al., 1996; Masson et al., 2001), suggère que les fortes densités de filaments de *P. rubescens* dans le métalimnion peuvent modifier l'amplitude de migration des cladocères et notamment des daphnies. Les déplacements verticaux des daphnies ont en effet été observés uniquement entre l'épilimnion et le métalimnion au cours du cycle. En effet, lors des blooms, les fortes densités de filaments de *P. rubescens* présentes dans le métalimnion constituent une zone où la visibilité est faible et où les prédateurs visuels, en l'occurrence les corégones, ont probablement du mal à visualiser leurs proies. Ainsi, le bloom de *P. rubescens* pourrait représenter une zone refuge utile au zooplancton comme il a été proposé par Engström-Öst et al. (2006). Cette hypothèse semble plausible car les migrations représentent un coût énergétique important pour le zooplancton et les filaments de *P. rubescens* peuvent être ingérés par le zooplancton et notamment par les daphnies (Oberhaus et al., 2007) constituant ainsi un apport nutritif important notamment en terme de ressource de carbone (de Kluijver et al., 2012). Il n'est pas exclu également que le bloom de *P. rubescens*, à défaut de constituer une zone refuge, puisse être considéré comme une barrière physique difficile à traverser pour le zooplancton et ainsi expliquer les faibles abondances de zooplancton dans l'hypolimnion. Ainsi en modifiant l'amplitude de migrations du zooplancton, la présence des blooms de *P. rubescens* pourrait potentiellement augmenter les niveaux de MCs ingérés par les poissons *via* le

zooplancton et ainsi conduire à des contaminations plus fortes des espèces piscicoles. En effet, en restant dans la zone de bloom, le zooplancton pourrait ingérer des quantités de filaments plus importantes que lors d'un passage ponctuel dans le métalimnion, comme dans le cas des migrations classiques, et par conséquent accumuler plus de MCs qui par la suite pourraient être transférer aux poissons zooplanctonophages.

Ainsi, en fonction des déplacements verticaux et de l'ingestion des MCs, le rôle du compartiment zooplanctonique en tant que vecteur des MCs (MCs encapsulées dans les organismes zooplanctoniques) jusqu'aux poissons peut donc changer. Nous avons considéré, à partir de l'abondance de certains groupes zooplanctoniques dans chaque couche d'eau, et de leurs teneurs en toxines, les stocks de MCs portés par le zooplancton qui peuvent varier aussi bien à l'échelle saisonnière que journalière. Au crépuscule et pendant la nuit, les concentrations en MCs « véhiculées » par le zooplancton semblent être maximales dans l'épilimnion, périodes au cours desquelles les juvéniles de perches sont susceptibles d'ingérer les plus fortes quantités de MCs. En revanche dans le métalimnion, c'est à l'aube, au cours de la journée et au crépuscule que les quantités maximum de MCs véhiculées par le zooplancton semblent être présentes et c'est à ces périodes que les corégones sont susceptibles d'être majoritairement intoxiqués par les MCs. Ces observations nécessitent des études supplémentaires afin de vérifier si les observations déjà réalisées au cours de notre cycle se répètent et sont donc des phénomènes récurrents.

La connaissance de ces variations temporelles dans le niveau de toxines portées par les proies des poissons ne prend son intérêt en terme de risque de contamination pour le poisson que si par ailleurs, le régime alimentaire (et sa variabilité) et les capacités des poissons à éliminer les toxines ingérées par leur alimentation sont appréhendés.

### **6.3 Importance des habitudes alimentaires des poissons et des processus de détoxification existants chez les espèces piscicoles cibles.**

Lors des blooms de cyanobactéries, les niveaux de contamination des poissons zooplanctonophages varient d'une part avec les changements du bol alimentaire des poissons qui

ont lieu directement sous l'influence des variations de quantités des différentes ressources zooplanctoniques disponibles et de leur âge. Par ailleurs il est important de prendre en compte l'activité des processus de détoxification mis en jeu lors de l'ingestion des MCs. L'analyse des contenus stomacaux des corégones du lac d'Hallwil révèle la présence d'importantes quantités de larves de *Chaoborus* et la présence de daphnies, en moindre quantité, dans la majorité des poissons analysés et prélevés au cours du bloom. Ainsi, nous avons pu montrer que les larves de *Chaoborus* et les daphnies constituent respectivement la source principale et secondaire de MCs (apporté par l'alimentation) à cette période pour les corégones du lac d'Hallwil. Cependant, dans les lacs péri-alpins français et notamment dans le lac du Bourget, les larves de *Chaoborus* sont peu présentes et ne peuvent donc pas constituer un vecteur principal de MCs pour les corégones lors des blooms. En revanche dans ces lacs, il faut noter la présence d'importantes quantités de cladocères prédateurs tels que les *Leptodora* et les *Bythotrephes* qui constituent une part majeure du bol alimentaire des corégones du mois de Juin jusqu'à l'hiver (Ponton et Gerdeaux, 1988) et donc probablement une source de MCs lors des blooms. Cependant, notre étude ne permet pas d'affirmer que ces cladocères prédateurs présents sur le lac du Bourget contiennent des MCs et des analyses complémentaires sont nécessaires afin de valider cette hypothèse. Néanmoins, compte-tenu de la position trophique de ces cladocères prédateurs et des phénomènes de bio-dilution observées pour les MCs dans les réseaux trophiques (Kozlowsky-Suzuki et al., 2012), on est en mesure de penser que l'accumulation des MCs par ces cladocères prédateurs est limitée tout comme pour les larves de *Chaoborus* qui sont présentes sur le lac d'Hallwil. Ainsi, en s'alimentant d'organismes prédateurs qui contiennent moins de MCs que des organismes brouteurs tels que les daphnies et les bosmines, les corégones limitent les quantités de MCs ingérées et donc potentiellement les effets néfastes de ces toxines lorsque les plus fortes concentrations en *P. rubescens* et en MCs sont enregistrées. En effet, la consommation de daphnies par les corégones est restreinte au mois d'Avril et de Mai principalement, période à laquelle les abondances de *P. rubescens* sont habituellement encore faibles et ainsi le transfert de MCs *via* les relations trophiques est quasi inexistant (Briand et al., 2005). Il faut également souligner que, dans les contenus stomacaux des corégones analysés, la présence de filaments de *P. rubescens* a pu être observée en très faible quantité. La part des MCs accumulée par le corégone et issue de l'ingestion des filaments est probablement négligeable. En effet, les filaments de *P. rubescens* ne constituent pas une cible alimentaire à proprement parlé pour le

corégone et sont ingérés accidentellement lors de l'ingestion des proies zooplanctoniques. De plus, le corégone serait notamment capable d'éviter l'ingestion de filaments de *P. rubescens* en régurgitant les cyanobactéries ingérés (Ernst et al., 2006, 2007). Ainsi comme nous l'avons prouvé, le poisson ingère des toxines *via* son alimentation. Cependant, les processus de détoxification qui restent encore à élucider pourraient limiter les concentrations accumulées dans les organes des poissons et ainsi limiter les effets négatifs physiologiques potentiels des MCs. Les mesures de toxines réalisées sur les corégones, capturés lors des plus fortes concentrations en *P. rubescens*, révèlent la présence des MCs dans leurs intestins, leurs foies et leurs muscles. La littérature regorge de cas d'accumulation des MCs dans les organes des poissons présents lors des blooms de cyanobactéries (e.g. Magalhães et al., 2001; Malbrouck et Kestemont, 2006; Papadimitriou et al., 2010; Romo et al., 2011). Globalement, l'organe cible des MCs est le foie des poissons. C'est en effet dans cet organe que la majorité des MCs accumulées est mesurée. Concernant les autres organes, les résultats variables entre les différentes études ne permettent pas de tirer des conclusions définitives quant à la distribution des MCs dans l'organisme après leur ingestion. En effet, les différences d'accumulation des MCs entre les études peuvent être liées tout d'abord aux modes d'exposition des organismes aux MCs (baignade, injection, gavage), aux poissons utilisés (espèce, taille, capacité de détoxification), aux temps d'exposition, aux doses de MCs utilisées et également aux méthodes d'analyses utilisées (extraction, mesure) (Malbrouck et Kestemont, 2006). A ce jour, aucune étude n'avait été réalisée sur l'accumulation et la détoxification des MCs chez le corégone en dépit de l'extrême importance qu'ont ces processus dans la compréhension globale de l'impact des MCs sur cette espèce. Notre expérience réalisée par gavage des corégones montre qu'une ingestion de MCs semblable à celle qui peut être ingérée *via* le zooplancton en condition *in-situ* en une journée provoque une accumulation rapide des MCs dans le foie et le muscle des juvéniles de corégone. cette accumulation semble continue et ceci malgré l'activation de la GST, une enzyme de détoxification normalement responsable de la conjugaison des MCs au GSH avant son excrétion par le système biliaire. Ces résultats suggèrent qu'en cas d'exposition chronique, le corégone peut être fortement contaminé par les MCs. Cependant, ces observations sont à pondérer car au cours de nos expériences seuls des juvéniles de corégones ont pu être utilisés. A l'inverse, les mesures de toxines provenant des individus capturés en condition *in-situ* ont été réalisées sur des corégones adultes. Ainsi des différences notables de l'activité des enzymes de détoxification peuvent exister entre les

coréogones adultes et juvéniles d'autant plus que la littérature fait déjà référence de taux d'activités des enzymes de détoxification plus forts chez les organismes adultes (Oliveira et al., 2009).

En ce qui concerne les juvéniles de perche, l'analyse des contenus stomacaux des individus prélevés sur le lac du Bourget révèle qu'au cours du temps, la composition du bol alimentaire des poissons varie nettement. Ainsi au cours du mois d'août lorsque les concentrations en MCs présentes dans le seston sont maximum, les juvéniles de perche consomment essentiellement des daphnies puis au cours du mois de septembre la quantité de cladocères prédateurs comme *Leptodora* et *Bythotrephes* ingérée augmente et devient supérieure à la quantité de daphnies présentes dans les contenus. Au cours du bloom de *P. rubescens*, les niveaux de contamination des juvéniles de perche varient avec le temps et les plus forts niveaux de contamination sont observés lorsque les concentrations en MCs dans le seston sont les plus fortes. Comme les filaments de *P. rubescens* ne sont pas ingérés par les juvéniles de perche, le lien entre concentrations en *P. rubescens* et MCs et concentrations présentes dans le poisson démontre que les MCs accumulées dans la perche sont essentiellement issues de leur nourriture et notamment de l'ingestion de zooplancton contaminé. En dépit des concentrations relativement fortes en MCs présentes dans le seston du Bourget début août, les concentrations en MCs mesurées dans les foies et les muscles de perche sont très faibles. Différentes explications sont possibles : (i) malgré les fortes concentrations en MCs, la quantité de MCs transportée par les daphnies jusqu'aux juvéniles de perche pourraient être trop basses pour que ces toxines puissent s'accumuler de manière importante dans les poissons. (ii) les perches ont une capacité de détoxification qui leur permet d'éliminer une partie des MCs ingérées et donc de limiter l'accumulation des toxines. En effet, les résultats expérimentaux confirment le fait qu'une ingestion de MCs semblable à celle qui peut être ingérée *via* le zooplancton en condition *in-situ* en une journée provoque une accumulation des MCs dans les foies et les muscles de ces poissons. Cependant, les juvéniles de perche sont capables de détoxifier rapidement les MCs ingérées notamment dans le foie et ceci indépendamment d'une activation du système de détoxification qui fait intervenir la GST. Ces résultats suggèrent deux choses. D'une part, il est possible que le niveau de base de GST chez ces poissons soit suffisant pour détoxifier rapidement la quantité de toxine ingérée et d'autre part qu'une autre voie de détoxification, que celle faisant intervenir le GSH et la GST, puisse s'activer lors de l'ingestion de MCs. En effet, des études expérimentales



montrant la présence de métabolites des MCs conjugués à la cystéine en plus grande quantité que ceux conjugués au GSH semble confirmer cette hypothèse (He et al., 2012; Zhang et al., 2012). Ainsi, en conditions *in-situ*, l'activation de tels processus permet aux juvéniles de perche de limiter l'accumulation des MCs dans leurs organes et par conséquent de limiter les potentiels effets négatifs qui peuvent en résulter.

Au cours du mois de septembre, la diminution des concentrations en MCs dans les organes des juvéniles de perche est observée (en comparaison au mois d'août), et ceci conjointement à l'augmentation de la part de *Leptodora* dans les contenus stomacaux des poissons. La part de MCs transportée par le zooplancton prédateur est généralement plus faible que la part transportée par le zooplancton brouteur du fait de leur position trophique, par analogie aux données acquises pour les larves de *Chaoborus* du lac d'Hallwil, nous pouvons émettre l'hypothèse que les quantités de toxines ingérées par le poisson, *via* la consommation des prédateurs invertébrés *Leptodora*, sont insuffisantes pour entraîner une accumulation supplémentaire et permettent aux juvéniles de perche de détoxifier les MCs déjà accumulées au cours de la saison. A cette période, la diminution des concentrations en MCs présentes dans les organes des juvéniles du Bourget serait donc à la fois due à un changement de régime alimentaire mais également à la détoxification des MCs.

Il est intéressant de souligner que, dans le cas d'Hallwil, nous avons pu observer que des perches ayant un mode de vie en partie littoral pouvaient également être contaminées par les MCs. Dans les lacs, les populations de juvéniles de perche peuvent être présentes ou migrer dans la zone littorale au cours de l'été, et ceci indépendamment de la présence de cyanobactéries dans le milieu, afin d'éviter la pression de prédation importante de la zone pélagique et de consommer le zooplancton présent dans la végétation littorale (Winfield, 1986; Cech et al., 2005). La présence des juvéniles de perche en zone littorale, où *P. rubescens* ne se développe pas, limite donc les possibilités de contamination de ces poissons par les MCs. En effet, le zooplancton présent dans la zone littorale n'est probablement pas en contact avec des filaments de *P. rubescens* et ainsi *a priori* vierge de MCs. De plus, les poissons se nourrissent principalement de copépodes (cas de notre étude sur Hallwil), considérés comme des organismes sélectifs vis-à-vis de leur alimentation et qui ont tendance à éviter la consommation des cyanobactéries et par conséquent des MCs lorsqu'elles sont présentes dans les milieux (Wilson et al., 2006; Hansson et al., 2007).

Néanmoins, au cours de notre étude et malgré cette présence en zone littorale des juvéniles de perche, des MCs ont été mesurées dans les foies de perche mais à des concentrations bien inférieures à celles mesurées sur les perches du Bourget. Ces résultats suggèrent qu'en période de bloom, même les populations littorales de poissons peuvent être contaminées par les MCs. Les causes hypothétiques de cette contamination sont d'une part la présence de migrations horizontales des perches au cours de la journée dans le but de se nourrir (Wang et Eckmann, 1994) et d'autre part la présence cette fois-ci de migrations horizontales du zooplancton et plus spécialement des daphnies dans le but d'éviter la pression de prédation importante présente en milieu pélagique (Burks et al., 2002). Des daphnies ont effectivement été retrouvées dans le bol alimentaire de ces poissons (en moindres quantités en comparaison des copépodes). Dans les deux cas, ces phénomènes peuvent induire un contact entre les juvéniles de perche et le zooplancton contaminé de la zone pélagique et entraîner la contamination par les MCs des poissons littoraux.

L'analyse synthétique de ces résultats met en avant le fait que les quantités de toxines présentes dans les poissons sont à la fois dépendantes des concentrations en toxines produites par les cyanobactéries dans le milieu mais surtout des régimes alimentaires et des processus de détoxification mis en jeu par les différentes espèces piscicoles. Néanmoins, en fonction de leurs répartitions spatiales et des phénomènes physiques présents dans les lacs, les espèces piscicoles peuvent également être en contact avec les MCs par d'autres voies de contamination que les transferts trophiques et notamment *via* la baignade dans l'eau contenant des MCs.

## **6.4 La baignade, une autre voie de contamination pour les corégones et les juvéniles de perche ?**

Dans le cas de notre étude, du fait de leur préférence thermique (Mehner et al., 2010), les corégones se situent dans le métalimnion et dans l'hypolimnion supérieur en contact direct avec les filaments de *P. rubescens*. Ainsi, ils peuvent être exposés aux MCs *via* la consommation de zooplancton et/ou indirectement de filaments de cyanobactéries mais également *via* l'eau qui pourrait contenir des MCs. Face à la présence de zones denses en cyanobactéries, des

comportements d'agrégation mais aussi d'évitement par les poissons ont pu être mis en évidence (expérimentalement) avec cependant des résultats très variables et difficilement interprétables (Mastin et al., 2002 ; Engström-Öst et al., 2006). Des comportements d'agrégation des corégones dans les zones de blooms pourraient expliquer de fortes contaminations des poissons baignant dans un environnement toxique où les MCs sont potentiellement présentes dans l'eau. En revanche, des comportements d'évitement des zones de bloom pourraient induire un positionnement des corégones dans des couches d'eau où les MCs sont absentes et donc limiter la contamination des corégones par les MCs. Les résultats d'hydroacoustique obtenus en condition diurne sur le lac du Bourget ne mettent pas en évidence de tels comportements pour les corégones et ceci quelque soit leur taille. Les résultats exposés par Ernst et al. (2008) sur la même espèce dans le lac Ammersee, montrant une ségrégation spatiale entre le bloom de *P. rubescens* et les corégones, que les auteurs interprètent comme un potentiel phénomène d'évitement, ne semblent donc pas vérifiés par nos propres observations. Dans l'étude de Ernst et al. (2008), le corégone est situé entre 15 et 20 mètres et le pic de cyanobactéries entre 10 et 15 mètres. En revanche dans notre étude, le pic de *P. rubescens* et les corégones sont situés entre 15 et 20 mètres et aucun phénomène d'évitement n'a pu être mis en évidence. Ainsi la ségrégation spatiale observée entre *P. rubescens* et les corégones dans le lac d'Ammersee est donc probablement plus liée aux exigences écologiques différentes entre le corégone et la cyanobactérie plutôt qu'à un évitement volontaire des cyanobactéries par les poissons dans les lacs étudiés ici. Les corégones sont ainsi potentiellement en contact récurrent avec les filaments de *P. rubescens*, le zooplancton contaminé et l'eau contenant potentiellement des MCs. Cependant, l'accumulation des MCs par balnéation du corégone semble peu probable en conditions *in-situ* compte-tenu du fait que les microcystines sont des cyanotoxines intracellulaires qui n'ont pas vocation à être excrétées et donc présentes dans l'eau, excepté lors de la phase de sénescence des cellules ou lors d'attaques parasitaires, et notamment de virus ou de chytrides (Park et al., 1998; Briand et al., 2005; McElhiney et Lawton, 2005). Ainsi, il se peut que des « pulses » de contamination puissent se produire pour le corégone *via* la balnéation notamment au début de l'hiver ou lors d'attaques parasitaires. Cependant, au cours de notre travail, les mesures de toxines réalisées sur les corégones capturés lors des plus fortes concentrations en *P. rubescens* ne nous permettent pas d'évaluer si la présence potentielle de MCs dans l'eau a pu engendrée une accumulation des toxines dans ces poissons.

Pour les juvéniles de perche, le contexte est différent, ils ont été observés dans l'épilimnion des lacs et donc jamais en contact direct avec le bloom de *P. rubescens*. Cette position dans la colonne d'eau est expliquée par leur préférence thermique et limite donc les contacts potentiels directs avec les filaments de la cyanobactérie et l'eau contenant des MCs (Wang et Eckmann, 1994; Wang et Appenzeller, 1998). Ainsi, contrairement au corégone présent dans la zone de bloom, la contamination des juvéniles de perche aux MCs semble être tributaire uniquement des échanges trophiques *via* la consommation de zooplancton. Cependant, il n'est pas impossible que lors des périodes de forts vents et sous l'effet des ondes internes qui induisent des mouvements verticaux de la masse d'eau de plus de 10 mètres (Cuypers et al., 2011), le bloom de *P. rubescens* et l'eau contenant des MCs puissent être présents au niveau de l'épilimnion et donc être en contact direct avec les juvéniles de perche. Cependant, cette hypothèse n'a pu être vérifiée par notre étude et des données complémentaires sont nécessaires afin de savoir si de tels événements sont possibles lors des conditions de forts vents. Ainsi, sur la base des données de répartition spatiale que nous possédons pour les juvéniles de perche, on est en droit de penser que la contamination par les MCs s'est limitée à la consommation de proies zooplanctoniques contaminées et que l'ingestion de filaments et la balnéation dans une eau contenant des MCs semblent peu probables pour cette espèce.

Compte-tenu de nos observations, nous privilégions les relations trophiques comme voie principale de contamination aux MCs pour ces deux espèces de poisson. Néanmoins, il n'est pas exclu que de manière ponctuelle, les deux espèces piscicoles puissent être en contact avec de l'eau contenant des MCs, ce qui le cas échéant pourrait contribuer à une contamination plus importante des poissons.

## **6.5 Vers l'estimation des risques liés à la contamination des juvéniles de perche et des corégones par les MCs : limites des données acquises et perspectives**

La contamination des poissons par les MCs est à l'origine de nombreuses perturbations

comportementales, histologiques et physiologiques (Malbrouck et Kestemont 2006). Afin d'estimer le risque de la contamination des juvéniles de perche et des corégones, des analyses histologiques et de génotoxicité ont été réalisées au cours de cette étude. Les résultats obtenus sur les juvéniles de corégone et de perche concernant la génotoxicité de la MC-LR montrent qu'à de faibles concentrations ingérées, des dommages transitoires à l'ADN peuvent être observés et ceci conjointement à l'accumulation des MCs. Ainsi, la consommation de zooplancton contaminé aux MCs par le corégone et les juvéniles de perche en période de bloom pourrait induire des dommages au niveau de leur ADN pouvant provoquer de nombreuses perturbations physiologiques chez ces poissons particulièrement lors d'une exposition chronique aux MCs comme en conditions *in-situ*. En revanche, l'analyse histologique des foies et des intestins des juvéniles de perches (en situation expérimentale) ne révèle aucune altération structurelle de ces organes à la suite de l'ingestion de MCs. Même lors d'une exposition chronique des juvéniles de perche et des corégones aux MCs comme sur le lac du Bourget en 2009, l'analyse histologique des organes des poissons ne montre aucune altération structurelle de ces organes. Ces résultats suggèrent que les concentrations de MCs absorbées par ces espèces piscicoles au cours des blooms de *P. rubescens*, que ce soit sur le lac du Bourget ou sur le lac d'Hallwil, ne représentent pas une menace directe pour eux (pour les concentrations de *P. rubescens* enregistrées) tout du moins d'un point de vue histologique.

En revanche, l'estimation réelle des risques d'une contamination aux MCs, pour les populations de corégones et de perches présentes dans les lacs étudiés, à partir de nos résultats expérimentaux reste difficile. En effet, dans les lacs, les cyanobactéries, et notamment le genre *Planktothrix*, produisent une variété importante de métabolites secondaires (autres que les MCs) qui sont également potentiellement toxiques pour les poissons (Keil et al., 2002; Viaggiu et al., 2004; Blom et al., 2006). Ces composés multiples et toxiques sont probablement ingérés par le zooplancton en même temps que les MCs et par la suite sont transférés aux poissons *via* les échanges trophiques. Plusieurs études semblent montrer une toxicité supérieure des extraits crus de cyanobactéries, composés de multiples composés potentiellement toxiques, par comparaison avec les MCs purifiées (Oberemm et al., 1999; Pietsch et al., 2001; Ibelings et Havens, 2008). Par ailleurs, nos résultats expérimentaux révèlent les effets de la MC-LR, le variant le plus toxique de la MC (Chorus et Bartram, 1999). Or *P. rubescens*, bien que produisant de la MC-LR, est connue pour produire de large quantités de MC-RR comme cela a été démontré sur le lac d'Hallwil, ce

variant est considéré comme plus de 100 fois moins toxique que le variant LR (Chorus et Bartram, 1999). Ainsi, ces différences peuvent entraîner des effets différentiels sur les poissons exposés en milieu naturel de manière chronique à de nombreux métabolites bioactifs et sur les poissons exposés en situation expérimentale de manière ponctuelle à un seul variant de la MC, variant qui de plus n'est pas celui majoritairement produit par *P. rubescens*. Les expérimentations donnent donc une estimation imparfaite des risques en milieu naturel. De plus les limites méthodologiques actuelles concernant les mesures des MCs dans les différents compartiments trophiques entachent la faisabilité d'une estimation juste des risques et les potentialités de comparaison inter-études.

En effet, concernant les concentrations en MCs mesurées dans la littérature, les comparaisons entre études sont difficiles à réaliser compte-tenu des différences existantes entre les méthodes d'extractions et d'analyses utilisées par les différents auteurs. De plus, La majorité des valeurs de MCs données sont probablement sous-évaluées par rapport aux concentrations en MCs réellement accumulées. En effet, une fois dans l'organisme, la MC peut se trouver à la fois sous forme libre, facilement excrétée par l'organisme, et sous forme liée de manière covalente aux protéines phosphatases et donc difficilement excrétée. La majorité des études ne font rapport que de la MC libre accumulée qui représente, selon les estimations réalisées sur le saumon, seulement 24% de la MC totale accumulée (Williams et al., 1997). C'est également le cas dans notre étude où le protocole d'extraction des MCs n'a permis de cibler que la partie libre des MCs. De plus, l'utilisation de kits ELISA anti-ADDA au cours de notre étude complique l'évaluation des concentrations en MCs pure accumulée dans les organes des poissons et, par conséquent, l'évaluation des risques pour les poissons. En effet contrairement aux méthodes d'analyses chromatographiques et spectrométriques qui permettent de distinguer les différents variants de MCs ainsi que leurs composés de détoxification, cette méthode d'analyse bien que spécifique aux MCs et sensible en terme de détection ne permet pas de faire cette distinction (Metcalf et al., 2000). Par ailleurs, un point important concernant l'interprétation et la robustesse de nos résultats est la nécessité de vérifier la répétabilité des observations obtenues lors des échantillonnages *in-situ*.

Les résultats obtenus au cours du cycle nycthéral réalisé sur le lac d'Hallwil ne proviennent que d'échantillons prélevés au cours d'un seul cycle, en raison de la météo défavorable qui nous a contraint à interrompre les prélèvements lors du deuxième cycle nycthéral. L'interprétation et

les conclusions qui peuvent être tirées de ces résultats nécessitent donc d'être confirmées par des études complémentaires notamment concernant les variations journalières des concentrations en MCs ainsi que les migrations/déplacements verticaux que réalisent les organismes zooplanctoniques. De plus, en l'état actuel des choses, l'extrapolation de nos observations à d'autres systèmes écologiques à l'échelle globale semble compliquée.

Il est important de signaler, en termes de généralisation de nos observations aux systèmes lacustres affectés par les blooms à cyanobactéries, que les effets observés de la cyanobactérie *P. rubescens* sur les populations de poissons au cours de cette étude sont difficilement transposables aux effets qui pourraient être observées pour d'autres genres de cyanobactéries. En effet, *P. rubescens* est une cyanobactérie particulière qui de part sa présence en conditions mésotrophes, sa position dans la colonne d'eau et la présence d'acides gras polyinsaturés essentiels, semble se différencier des autres genres de cyanobactéries présents à l'échelle de la planète qui se développent à la surface des lacs eutrophes et dont les intensités de blooms et les quantités de toxines produites peuvent être supérieures à celles mesurées au cours de notre étude.

## 7 Conclusion générale et perspectives

De part son approche multidisciplinaire (hydroacoustique, écologie du plancton, analyses de contamination des organismes et de réponses physiologiques, ...) s'appuyant à la fois sur des mesures de terrain et des investigations expérimentales, ce travail nous a permis de progresser dans la compréhension (1) des voies de transfert des cyanotoxines (2) de certains effets des blooms de *P. rubescens* sur les populations de poissons des lacs péri-alpins et plus spécifiquement sur deux espèces fortement commercialisées en Europe, les corégones et les juvéniles de perche. Depuis 2010 les blooms de *P. rubescens* ont disparu sur le lac du Bourget alors que dans le lac d'Hallwil de très fortes concentrations de la cyanobactérie sont encore observées dans le métalimnion. Même si le statut trophique des lacs semble particulièrement déterminant dans l'occurrence des blooms de *P. rubescens*, des efforts sont encore à fournir afin de connaître au mieux les différents facteurs environnementaux qui influent sur la présence et la fréquence des blooms de *P. rubescens* dans les lacs, particulièrement dans un contexte de réchauffement climatique censé favoriser l'occurrence des cyanobactéries (O'Neil et al., 2012).

Certaines des perspectives discutées ici s'inscrivent dans le prolongement des données acquises au cours de ce travail. Il s'agit notamment de valider certaines observations obtenues de manière unique (répétition de suivis temporels à court terme par exemple), de compléter l'analyse des voies de transfert trophique (rôle des communautés protistes dans ces transferts par exemple) et l'impact en termes qualitatifs de la consommation de cyanobactéries par les herbivores, et affiner l'importance et la variabilité dans les processus de détoxification chez les poissons ou d'autres organismes pélagiques.

Toutefois, d'autres perspectives, qui ne s'incrivent pas dans la continuité directe des résultats obtenus ici, méritent d'être évoquées, il s'agit notamment de mieux appréhender la diversité des molécules toxiques associées aux cyanobactéries.

En effet, les cyanobactéries sont connues pour produire une diversité importante de molécules toxiques dont les effets sur les réseaux trophiques et plus globalement sur le fonctionnement des écosystèmes sont encore en partie méconnus. Afin d'évaluer au mieux les effets toxiques potentiels de *P. rubescens* dans les réseaux trophiques lacustres, l'une des voies importante à poursuivre concerne l'identification des différents variants de MCs, les autres toxines et métabolites secondaires potentiellement toxiques qui peuvent être produits par cette



cyanobactérie et transférés au sein des réseaux trophiques. Ainsi l'absorption par les organismes zooplanctoniques et piscicoles de « cocktails » toxiques pourrait induire des impacts bien plus importants que ceux observés dans la littérature ne prenant compte généralement que les effets d'un seul composé toxique. De plus, dans un contexte de risque sanitaire des aliments, il semble indispensable de connaître les autres molécules toxiques qui, comme pour les MCs, pourraient être transférées jusqu'aux poissons et par la suite potentiellement poser un problème de santé humaine pour les espèces piscicoles consommées. Parmi ces molécules toxiques, on peut citer le cas de la BMAA, un acide aminé non protéique potentiellement produit par de nombreux genres de cyanobactéries, qui pourrait être impliquée dans l'induction de maladies neurodégénératives (Murch et al., 2004; Cox et al., 2005). Les connaissances actuelles concernant la BMAA sont encore très lacunaires, tant concernant ses effets sur les divers compartiments écosystémiques que son transfert au sein des écosystèmes.

A la vue des résultats obtenus concernant les transferts de microcystines, nous avons souligné la nécessité de prendre en compte la variabilité temporelle (à différentes échelles) pour comprendre les processus de contamination jusqu'au poisson. En effet au cours de notre étude l'existence de variations importantes de la production de MCs à l'échelle journalière (*in situ*) a été notamment révélée. Dans le prolongement, il semble important de focaliser les prochaines recherches sur la répliquabilité de ces observations et sur la mise en évidence des facteurs explicatifs d'un tel phénomène. De telles variations de concentrations en MCs produites pourraient expliquer des variations de contamination importantes des réseaux trophiques à l'échelle journalière conjointement aux habitudes de vie (régimes alimentaires et migrations) du zooplancton mais aussi des poissons. En effet, notre étude met en avant le rôle primordial des différents organismes zooplanctoniques dans le transfert des MCs au sein des réseaux trophiques et dans les rythmes de contaminations des espèces piscicoles aussi bien à l'échelle saisonnière que journalière.

Les résultats *in-situ* obtenus au cours de ce travail mettent en évidence pour la première fois le transfert direct des MCs des espèces zooplanctoniques herbivores aux espèces zooplanctoniques prédatrices qui consomment très certainement, non pas des filaments de cyanobactérie mais du zooplancton herbivore lui même contaminé par les MCs. Ces résultats permettent d'alimenter les réflexions concernant les interactions trophiques complexes qui s'opèrent dans les réseaux planctoniques. Afin d'affiner la connaissance relative à ces interactions, des questions

intéressantes (en termes d'écologie trophique) se posent concernant le rôle du micro-zooplancton et plus globalement de la boucle microbienne dans le transfert des MCs au sein du compartiment zooplanctonique et des réseaux trophiques. L'objectif pourrait être d'évaluer si des organismes comme les flagellés et des ciliés hétérotrophes sont capables de brouter les filaments de *P. rubescens* et/ou le cortège microbien (phycosphère) associé aux blooms et ainsi d'accumuler les MCs afin de mieux comprendre leurs rôles et leurs implications dans le transfert des toxines jusqu'aux niveaux trophiques supérieurs. Ces avancées s'inscriraient plus particulièrement dans la compréhension du fonctionnement des réseaux trophiques planctoniques et la connexion entre réseau microbien et réseau herbivore.

Egalement dans le domaine de l'analyse du fonctionnement des réseaux trophiques planctoniques, des questions sont encore en suspend et notamment concernant les contraintes énergétiques que peut constituer la consommation de *P. rubescens* pour le macro-zooplancton. Nos résultats montrent que certains herbivores consomment cette cyanobactérie, et même s'ils ne consomment pas seulement cette ressource, la prépondérance des cyanobactéries en période de blooms conduit à s'interroger sur les impacts en termes qualitatifs pour le zooplancton. En effet, les cyanobactéries sont des organismes considérés comme de mauvaise qualité nutritionnelle par comparaison avec le phytoplancton classique tels que les chlorophycées, cryptophycées ou encore les diatomées. Cette contrainte de qualité est notamment expliquée à la fois par un manque en composés essentiels mais également par la présence de toxines qui demande au zooplancton un coût énergétique supplémentaire lié à la détoxification de ces composés. Cette énergie dépensée n'est donc pas utilisée pour la croissance et la reproduction des organismes. Ainsi face à cette contrainte énergétique, les espèces de zooplancton se nourrissant de cyanobactéries pourraient devenir déficientes en certains composés essentiels et constituer une nourriture à la fois toxique et *a priori* de faible qualité nutritionnelle pour les poissons zooplanctonophages. Plus globalement l'apparition des blooms toxiques pourrait entraîner un affaiblissement des quantités d'énergie contenues et transférées dans les écosystèmes touchés et impacter de manière importante les compartiments trophiques supérieurs et notamment le compartiment piscicole dont l'intérêt écologique, économique et récréationnel est primordial.

La présence de MCs dans les muscles et les foies des corégones et des juvéniles de perches observée au cours de ce travail révèle la présence d'un transfert des MCs des cyanobactéries aux poissons principalement *via* la consommation de zooplancton qui semble la voie principale de

contamination pour les poissons. Cependant, les processus de détoxification peuvent influencer sur les teneurs en toxines, on a notamment révélé que la détoxification semble être activée chez les corégones et de manière plus efficace chez les juvéniles de perche après l'ingestion de MCs afin de limiter l'accumulation et la toxicité et par conséquent les impacts négatifs de celles-ci, notamment dans le cas d'une contamination chronique à laquelle les poissons sont exposés au cours de blooms (d'intensités modérées à plus fortes) qui perdurent sur de longues périodes au cours de l'année. Malgré l'activation de ces processus de détoxification, des dommages transitoires au niveau de l'ADN ont été observés chez les deux espèces de poissons. Dans le cas d'une contamination chronique, ces dommages à l'ADN pourraient ne pas être réparés et présenter des dangers importants pour les populations de ces deux espèces.

Il est par ailleurs important de garder en mémoire que les processus d'accumulation au cours de ce travail ont été étudiés sans faire la distinction entre MCs libres et liées mais également sans prendre en compte les différences qui peuvent exister entre les différentes formes de MCs. Aussi il est souhaitable lors de prochaines recherches de se focaliser sur l'étude à la fois des MCs libres et liées ainsi que sur les différences d'accumulation qui peuvent exister entre les deux principaux variants (LR et RR) produits par *P. rubescens* qui diffèrent de part leur toxicité. De plus, l'identification et la quantification des composés de détoxification des MCs (moins toxiques que les molécules mères) dans les différents organes de poissons permettraient de mieux connaître les voies enzymatiques impliquées dans la détoxification des MCs et d'évaluer au mieux les impacts négatifs réels de ces toxines sur ces deux espèces de poisson. En ce qui concerne la génotoxicité des MCs sur les poissons, il semble assez pertinent de réaliser des analyses complémentaires sur des cellules germinales afin d'évaluer les potentiels impacts des MCs sur les processus de reproduction, d'embryogénèse et d'ontogénèse afin d'élucider les impacts potentiels de cette toxine sur la dynamique des populations de poisson à plus long terme.

## 8 Abréviations

**ADN** : Acide désoxyribonucléique  
**AGPI** : Acides gras polyinsaturés essentiels  
**AlaAT** : Alanine aminotransférase  
**ARN** : Acide ribonucléique  
**AspAT** : Aspartate aminotransférase  
**ATP** : Adénosine triphosphate  
**ATPases** : ATP-synthases  
**BMAA** :  $\beta$ -N-méthylamino-L-alanine  
**Ca<sup>2+</sup>** : Calcium  
**CAT** : Catalase  
**CO<sub>2</sub>** : Dioxyde de carbone  
**Cys** : Cystéine  
**Da** : Dalton  
**Eq. Chl.a** : Equivalent Chlorophylle *a*  
**GPx** : Glutathion peroxydase  
**GSH** : Glutathion  
**GST** : Glutathion S-transférase  
**GTXs** : Gonyautoxines  
**HPLC/PDA** : High-performance liquid chromatography/photodiode array ou chromatographie liquide haute performance couplée à un détecteur UV à barrette de diodes  
**I.C.B.N** : International code of botanical nomenclature ou code international de nomenclature de botanique  
**I.C.P.N** : International code of nomenclature of prokaryotes ou code international de nomenclature des procaryotes  
**K<sup>+</sup>** : Potassium  
**LC-MS/MS** : Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry ou chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem  
**LDH** : Lactate déshydrogénase  
**LPS** : Lipopolysaccharides  
**MCs** : Microcystines  
**Mdha** : N-méthyl-déhydroalanine  
**Measp** : D-érythro- $\beta$ -méthyl-D-acide aspartique  
**N<sub>2</sub>** : Diazote  
**Na<sup>+</sup>** : Sodium  
**NODs** : Nodularines  
**NRPS** : Non-ribosomal peptides synthetase ou peptides synthétases non ribosomaux  
**O<sub>2</sub>** : Dioxygène  
**OATPs** : Organic Anion Transporting Polypeptides ou polypeptides transporteurs d'anions organiques  
**PAR** : Photosynthetically active radiation ou rayonnement photosynthétique actif  
**PKS** : Polyketide synthase ou polykétide synthase  
**POD** : Peroxydase  
**PP** : Protéines phosphatases

**P.S** : Poids sec

**PSP** : Paralytic shellfish poisoning ou phénomènes d’empoisonnement paralysant par les fruits de mer

**ROS** : Reactive oxygen species ou espèces réactives de l’oxygène

**UV** : Ultraviolet

## 9 Références

- Abrantes, N., A. Nogueira, and F. Gonçalves. 2009. Short-term dynamics of cladocerans in a eutrophic shallow lake during a shift in the phytoplankton dominance. *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology* **45**: 237–245.
- Agha, R., S. Cirés, L. Wörmer, J. A. Domínguez, and A. Quesada. 2012. Multi-scale strategies for the monitoring of freshwater cyanobacteria: reducing the sources of uncertainty. *Water research* **46**: 3043–53.
- Albay, M., R. Akcaalan, H. Tufekci, J. S. Metcalf, K. A. Beattie, and G. A. Codd. 2003. Depth profiles of cyanobacterial hepatotoxins (microcystins) in three Turkish freshwater lakes. *Hydrobiologia* **505**: 89–95.
- Allen, M. M. 1984. Cyanobacterial cell inclusions. *Annual review of microbiology* **38**: 1–25.
- Amado, L., and J. Monserrat. 2010. Oxidative stress generation by microcystins in aquatic animals: Why and how. *Environment International* **36**: 226–235.
- Ame, M., L. Galanti, M. Menone, M. Gerpe, V. Moreno, and D. Wunderlin. 2010. Microcystin-LR, -RR, -YR and -LA in water samples and fishes from a shallow lake in Argentina. *Harmful Algae* **9**: 66–73.
- Anderson, D. 1994. Red tides. *Scientific American* **271**: 52–58.
- Arter, H. E. 1989. Effect of eutrophication on species composition and growth of freshwater mussels (Mollusca, Unionidae) in Lake. *Aquatic sciences* **51**: 87–99.
- Atencio, L., I. Moreno, A. Jos, S. Pichardo, R. Moyano, A. Blanco, and A. M. Cameán. 2008. Dose-dependent antioxidant responses and pathological changes in tenca (*Tinca tinca*) after acute oral exposure to *Microcystis* under laboratory conditions. *Toxicon* **52**: 1–12.
- Baganz, D., G. Staaks, S. Pflugmacher, and C. E. W. Steinberg. 2004. Comparative study of microcystin-LR-induced behavioral changes of two fish species, *Danio rerio* and *Leucaspisus delineatus*. *Environmental Toxicology* **19**: 564–570.
- Baganz, D., G. Staaks, and C. Steinberg. 1998. Impact of the cyanobacteria toxin, microcystin-LR on behaviour of zebrafish, *Danio rerio*. *Water Research* **32**: 948–952.
- Baumann, H. I., and F. Jüttner. 2008. Inter-annual stability of oligopeptide patterns of *Planktothrix rubescens* blooms and mass mortality of *Daphnia* in Lake Hallwilersee. *Limnologia - Ecology and Management of Inland Waters* **38**: 350–359.

- Becker, M., and R. Eckmann. 1992. Plankton selection by pelagic european whitefish in Lake Constance: dependency on season and time of day. *Polish Archives of Hydrobiology* **39**: 393–402.
- Bednarska, A., and P. Dawidowicz. 2007. Change in filter-screen morphology and depth selection: Uncoupled responses of *Daphnia* to the presence of filamentous cyanobacteria. *Limnology and Oceanography* **52**: 2358–2363.
- Best, J. H., S. Pflugmacher, C. Wiegand, F. B. Eddy, J. S. Metcalf, and G. A. Codd. 2002. Effects of enteric bacterial and cyanobacterial lipopolysaccharides, and of microcystin-LR, on glutathione S-transferase activities in zebra fish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* **60**: 223–231.
- Bittencourt-Oliveira, M. D. C., P. Kujbida, K. H. M. Cardozo, V. M. Carvalho, A. D. N. Moura, P. Colepicolo, and E. Pinto. 2005. A novel rhythm of microcystin biosynthesis is described in the cyanobacterium *Microcystis panniformis* Komárek et al. *Biochemical and biophysical research communications* **326**: 687–94.
- Blaha, L., R. Kopp, K. Simkova, and J. Mares. 2004. Oxidative stress biomarkers are modulated in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.) exposed to microcystin-producing cyanobacterial water bloom. *Acta Veterinaria* **73**: 477–482.
- Blom, J. F., H. I. Baumann, G. Codd, and F. Jüttner. 2006. Sensitivity and adaptation of aquatic organisms to oscillapeptin J and [D-Asp<sup>3</sup>,(E)-Dhb<sup>7</sup>]microcystin-RR. *Archiv für Hydrobiologie* **167**: 547–559.
- Blom, J. F., and F. Jüttner. 2005. High crustacean toxicity of microcystin congeners does not correlate with high protein phosphatase inhibitory activity. *Toxicon* **46**: 465–470.
- Blom, J. F., J. A. Robinson, and F. Jüttner. 2001. High grazer toxicity of [D-Asp<sup>3</sup>,(E)-Dhb<sup>7</sup>]microcystin-RR of *Planktothrix rubescens* as compared to different microcystins. *Toxicon* **39**: 1923–1932.
- Boyer, J., G. Rollwagen-Bollens, and S. M. Bollens. 2011. Microzooplankton grazing before, during and after a cyanobacterial bloom in Vancouver Lake, Washington, USA. *Aquatic Microbial Ecology* **64**: 163–174.
- Brett, M., and D. Müller-Navarra. 1997. The role of highly unsaturated fatty acids in aquatic foodweb processes. *Freshwater Biology* **38**: 483–499.
- Briand, J. F., S. Jacquet, C. Flinois, C. Avois-Jacquet, C. Maisonnète, B. Leberre, and J. F. Humbert. 2005. Variations in the microcystin production of *Planktothrix rubescens* (Cyanobacteria) assessed from a four-year survey of Lac du Bourget (France) and from laboratory experiments. *Microbial Ecology* **50**: 418–428.

- Briand, J.-F., S. Jacquet, C. Bernard, and J.-F. Humbert. 2003. Health hazards for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems. *Veterinary Research* **34**: 361–377.
- Bright, D. I., and A. E. Walsby. 2000. The daily integral of growth by *Planktothrix rubescens* calculated from growth rate in culture and irradiance in Lake Zürich. *New Phytologist* **146**: 301–316.
- Brookes, J. D., and G. g. Ganf. 2001. Variations in the buoyancy response of *Microcystis aeruginosa* to nitrogen, phosphorus and light. *Journal of Plankton Research* **23**: 1399–1411.
- Bury, N. ., A. . Newlands, F. . Eddy, and G. . Codd. 1998. In vivo and in vitro intestinal transport of 3H-microcystin-LR, a cyanobacterial toxin, in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* **42**: 139–148.
- Bury, N. R., J. C. McGeer, F. B. Eddy, and G. A. Codd. 1997. Liver damage in brown trout, *Salmo trutta L.*, and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), following administration of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR via the dorsal aorta. *Journal of Fish Diseases* **20**: 209–215.
- Bürgi, H., and P. Stadelmann. 2002. Change of phytoplankton composition and biodiversity in Lake Sempach. *Hydrobiologia* **469**: 33–48.
- Campos, A., and V. Vasconcelos. 2010. Molecular Mechanisms of Microcystin Toxicity in Animal Cells. *International Journal of Molecular Sciences* **11**: 268–287.
- Canfield, D. E. 2005. The early history of atmospheric oxygen: Homage to Robert M. Garrels. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences* **33**: 1–36.
- Carbis, C., G. Rawlin, G. Mitchell, J. Anderson, and I. McCauley. 1996. The histopathology of carp, *Cyprinus carpio L.*, exposed to microcystins by gavage, immersion and intraperitoneal administration. *Journal of Fish Diseases* **19**: 199–207.
- Carey, C. C., B. W. Ibelings, E. P. Hoffmann, D. P. Hamilton, and J. D. Brookes. 2012. Eco-physiological adaptations that favour freshwater cyanobacteria in a changing climate. *Water research* **46**: 1407–1394.
- Carmichael, W. W. 1992. Cyanobacteria secondary metabolites—the cyanotoxins. *Journal of Applied Microbiology* **72**: 445–459.
- Carr, N. G., and B. A. Whitton. 1982. *The Biology of Cyanobacteria*. N.G. Carr and B.A. Whitton [eds.]. University of California Press; New edition edition (1 July 1992).
- Cazenave, J., M. de los A. Bistoni, S. F. Pesce, and D. A. Wunderlin. 2006a. Differential detoxification and antioxidant response in diverse organs of *Corydoras paleatus* experimentally exposed to microcystin-RR. *Aquatic Toxicology* **76**: 1–12.



- Cazenave, J., M. de los Á. Bistoni, E. Zwirnmann, D. A. Wunderlin, and C. Wiegand. 2006b. Attenuating effects of natural organic matter on microcystin toxicity in zebra fish (*Danio rerio*) embryos—benefits and costs of microcystin detoxication. *Environmental Toxicology* **21**: 22–32.
- Cazenave, J., M. L. Nores, M. Miceli, M. P. Díaz, D. A. Wunderlin, and M. A. Bistoni. 2008. Changes in the swimming activity and the glutathione S-transferase activity of *Jenynsia multidentata* fed with microcystin-RR. *Water Research* **42**: 1299–1307.
- Cazenave, J., D. A. Wunderlin, M. de los Á. Bistoni, M. V. Amé, E. Krause, S. Pflugmacher, and C. Wiegand. 2005. Uptake, tissue distribution and accumulation of microcystin-RR in *Corydoras paleatus*, *Jenynsia multidentata* and *Odontesthes bonariensis*: A field and laboratory study. *Aquatic Toxicology* **75**: 178–190.
- Cech, M., M. Kratochvil, J. Kubecka, V. Drastik, and J. Matena. 2005. Diel vertical migrations of bathypelagic perch fry. *Journal of Fish Biology* **66**: 685–702.
- Chan, F., M. L. Pace, R. W. Howarth, and R. M. Marino. 2004. Bloom formation in heterocystic nitrogen-fixing cyanobacteria: The dependence on colony size and zooplankton grazing. *Limnology and Oceanography* **49**: 2171–2178.
- Chellappa, N. T., and S. L. Chellappa. 2008. Harmful Phytoplankton Blooms and Fish Mortality in a eutrophicated reservoir of Northeast Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **51**: 833–841.
- Chorus, I., and J. Bartram 1999. Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management. World Health Organization Report. E & FN Spon, London and New York.
- Codd, G. A., L. F. Morrison, and J. S. Metcalf. 2005. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. *Toxicology and Applied Pharmacology* **203**: 264–272.
- Cox, P. A., S. A. Banack, and S. J. Murch. 2003. Biomagnification of cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease among the Chamorro people of Guam. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 13380–13383.
- Cox, P. A., S. A. Banack, S. J. Murch, U. Rasmussen, G. Tien, R. R. Bidigare, J. S. Metcalf, L. F. Morrison, G. A. Codd, and B. Bergman. 2005. Diverse taxa of cyanobacteria produce beta-N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 5074–5078.
- Cuypers, Y., B. Vincon-Leite, A. Groleau, B. Tassin, and J.-F. Humbert. 2011. Impact of internal waves on the spatial distribution of *Planktothrix rubescens* (cyanobacteria) in an alpine lake. *ISME Journal* **5**: 580–589.

- Czarnecki, O., M. Henning, I. Lippert, and M. Welker. 2006. Identification of peptide metabolites of *Microcystis* (Cyanobacteria) that inhibit trypsin-like activity in planktonic herbivorous *Daphnia* (Cladocera). *Environmental microbiology* **8**: 77–87.
- D’alelio, D., A. Gandolfi, A. Boscaini, G. Flaim, M. Tolotti, and N. Salmaso. 2011. *Planktothrix* populations in subalpine lakes: selection for strains with strong gas vesicles as a function of lake depth, morphometry and circulation. *Freshwater Biology* **56**: 1481–1493.
- Da Silva, R. R. P., O. R. Pires, and C. K. Grisolia. 2011. Genotoxicity in *Oreochromis niloticus* (Cichlidae) induced by *Microcystis* spp bloom extract containing microcystins. *Toxicon* **58**: 259–264.
- Davis, T. W., and C. J. Gobler. 2010. Grazing by mesozooplankton and microzooplankton on toxic and non-toxic strains of *Microcystis* in the Transquaking River, a tributary of Chesapeake Bay. *Journal of Plankton Research* **33**: 415–430.
- Davis, T. W., F. Koch, M. A. Marcoval, S. W. Wilhelm, and C. J. Gobler. 2011. Mesozooplankton and microzooplankton grazing during cyanobacterial blooms in the western basin of Lake Erie. *Harmful Algae* **15**: 26–35.
- De Bernardi, R., and G. Giussani. 1990. Are blue-green algae a suitable food for zooplankton? An overview. *Hydrobiologia* **200-201**: 29–41.
- Deblois, C. P., R. Aranda-Rodriguez, A. Giani, and D. F. Bird. 2008. Microcystin accumulation in liver and muscle of tilapia in two large Brazilian hydroelectric reservoirs. *Toxicon* **51**: 435–448.
- Deng, D., K. Zheng, F. Teh, P. Lehman, and S. Teh. 2010. Toxic threshold of dietary microcystin (-LR) for quart medaka. *Toxicon* **55**: 787–794.
- Dittmann, E., and T. Börner. 2005. Genetic contributions to the risk assessment of microcystin in the environment. *Toxicology and Applied Pharmacology* **203**: 192–200.
- Djediati, C., D. Moyenga, M. Malécot, K. Comte, C. Yéprémian, C. Bernard, S. Puiseux-Dao, and M. Edery. 2011. Oral toxicity of extracts of the microcystin-containing cyanobacterium *Planktothrix agardhii* to the medaka fish (*Oryzias latipes*). *Toxicon* **58**: 112–122.
- Dokulil, M. T., and K. Teubner. 2000. Cyanobacterial dominance in lakes. *Hydrobiologia* **438**: 1–12.
- Dokulil, M. T., and K. Teubner. 2005. Do phytoplankton communities correctly track trophic changes? An assessment using directly measured and palaeolimnological data. *Freshwater Biology* **50**: 1594–1604.
- Dokulil, M. T., and K. Teubner. 2012. Deep living *Planktothrix rubescens* modulated by environmental constraints and climate forcing. *Hydrobiologia* **698**: 29–46.

- Dyble, J., D. Gossiaux, P. Landrum, D. R. Kashian, and S. Pothoven. 2011. A Kinetic Study of Accumulation and Elimination of Microcystin-LR in Yellow Perch (*Perca Flavescens*) Tissue and Implications for Human Fish Consumption. *Marine Drugs* **9**: 2553–2571.
- El Ghazali, I., S. Saqrane, A. Carvalho, Y. Ouahid, B. Oudra, F. Del Campo, and V. Vasconcelos. 2009. Compensatory Growth Induced in Zebrafish Larvae after Pre-Exposure to a *Microcystis aeruginosa* Natural Bloom Extract Containing Microcystins. *International Journal of Molecular Sciences* **10**: 133–146.
- El Ghazali, I., S. Saqrane, A. P. Carvalho, Y. Ouahid, F. F. Del Campo, B. Oudra, and V. Vasconcelos. 2010a. Effect of different microcystin profiles on toxin bioaccumulation in common carp (*Cyprinus carpio*) larvae via *Artemia* nauplii. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **73**: 762–770.
- El Ghazali, I., S. Saqrane, A. P. Carvalho, Y. Ouahid, F. F. Del Campo, V. Vasconcelos, and B. Oudra. 2010b. Effects of the microcystin profile of a cyanobacterial bloom on growth and toxin accumulation in common carp *Cyprinus carpio* larvae. *Journal of Fish Biology* **76**: 1415–1430.
- Engström-Öst, J., M. Karjalainen, and M. Viitasalo. 2006. Feeding and Refuge Use by Small Fish in the Presence of Cyanobacteria Blooms. *Environmental Biology of Fishes* **76**: 109–117.
- Ernst, B. 2008. Investigations on the impacts of toxic cyanobacteria on fish. Dissertation.
- Ernst, B., B. Hitzfeld, and D. Dietrich. 2001. Presence of *Planktothrix* sp. and cyanobacterial toxins in Lake Ammersee, Germany and their impact on whitefish (*Coregonus lavaretus* L.). *Environmental Toxicology* **16**: 483–488.
- Ernst, B., S. J. Hoeger, E. O'Brien, and D. R. Dietrich. 2006. Oral toxicity of the microcystin-containing cyanobacterium *Planktothrix rubescens* in European whitefish (*Coregonus lavaretus*). *Aquatic Toxicology* **79**: 31–40.
- Ernst, B., S. J. Hoeger, E. O'Brien, and D. R. Dietrich. 2007. Physiological stress and pathology in European whitefish (*Coregonus lavaretus*) induced by subchronic exposure to environmentally relevant densities of *Planktothrix rubescens*. *Aquatic Toxicology* **82**: 15–26.
- Ernst, B., S. Hoeger, E. O'Brien, and D. Dietrich. 2009. Abundance and toxicity of *Planktothrix rubescens* in the pre-alpine Lake Ammersee, Germany. *Harmful Algae* **8**: 329–342.
- Falconer, I. R., and A. R. Humpage. 2006. Cyanobacterial (Blue-Green Algal) Toxins in Water Supplies: Cylindrospermopsins. *Environmental Toxicology* **21**: 299–304.
- Fastner, J., U. Neumann, B. Wirsing, J. Weckesser, C. Wiedner, B. Nixdorf, and I. Chorus. 1999. Microcystins (hepatotoxic heptapeptides) in german fresh water bodies. *Environmental Toxicology* **14**: 13–22.

- Ferrão-Filho, A., and S. Azevedo. 2003. Effects of unicellular and colonial forms of toxic *Microcystis aeruginosa* from laboratory cultures and natural populations on tropical cladocerans. *Aquatic Ecology* **37**: 23–35.
- Ferrão-Filho, A. da S., and B. Kozlowsky-Suzuki. 2011. Cyanotoxins: bioaccumulation and effects on aquatic animals. *Marine drugs* **9**: 2729–72.
- Ferrão-Filho, A. da S., B. Kozlowsky-Suzuki, and S. M. F. O. Azevedo. 2002. Accumulation of microcystins by a tropical zooplankton community. *Aquatic Toxicology* **59**: 201–208.
- Feuillade J. 1994. The cyanobacterium (blue-green algae) *Oscillatoria rubescens* D.C. *Archiv Für Hydrobiologie* **41**: 77–93.
- Feuillade, J., M. Feuillade, P. Blanc, I. D. Limnologie, and F.- Thonon. 1990. Alkaline phosphatase activity fluctuations and associated factors in a eutrophic lake dominated by *Oscillatoria rubescens*. *Hydrobiologia* **207**: 233–240.
- Fischer, W. J., S. Altheimer, V. Cattori, P. J. Meier, D. R. Dietrich, and B. Hagenbuch. 2005. Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin. *Toxicology and Applied Pharmacology* **203**: 257–263.
- Fischer, W. J., and D. R. Dietrich. 2000. Pathological and Biochemical Characterization of Microcystin-Induced Hepatopancreas and Kidney Damage in Carp (*Cyprinus carpio*). *Toxicol. Appl. Pharm.* **164**: 73–81.
- Fu, J., and P. Xie. 2006. The acute effects of microcystin LR on the transcription of nine glutathione S-transferase genes in common carp *Cyprinus carpio* L. *Aquatic Toxicology* **80**: 261–266.
- Gaete, V., E. Canelo, N. Lagos, and F. Zambrano. 1994. Inhibitory effects of *Microcystis aeruginosa* toxin on ion pumps of the gill of freshwater fish. *Toxicon* **32**: 121–127.
- Gerdeaux, D., O. Anneville, and D. Hefti. 2006. Fishery changes during re-oligotrophication in 11 peri-alpine Swiss and French lakes over the past 30 years. *Acta Oecologica* **30**: 161–167.
- Ghadouani, A., B. Pinel-Alloul, and E. E. Prepas. 2003. Effects of experimentally induced cyanobacterial blooms on crustacean zooplankton communities. *Freshwater Biology* **48**: 363–381.
- Grach-Pogrebinsky, O., B. Sedmak, and S. Carmeli. 2003. Protease inhibitors from a Slovenian Lake Bled toxic waterbloom of the cyanobacterium *Planktothrix rubescens*. *Tetrahedron* **59**: 8329–8336.
- Granéli, E., M. Weberg, and P. S. Salomon. 2008. Harmful algal blooms of allelopathic microalgal species: The role of eutrophication. *Harmful Algae* **8**: 94–102.

- Grossman, A. R., L. Bogorad, D. Bryant, J. Cobley, P. Conley, N. Federspiel, A. Glazer, D. Kehoe, C. Lagarias, P. Lemaux, M. Schaefer, and N. T. D. Marsac. 2003. A molecular understanding of complementary chromatic adaptation. *Photosynthesis Research* **76**: 207–215.
- Gulati, R., and W. Demott. 1997. The role of food quality for zooplankton: remarks on the state-of-the-art, perspectives and priorities. *Freshwater Biology* **38**: 753–768.
- Guo, N., and P. Xie. 2006. Development of tolerance against toxic *Microcystis aeruginosa* in three cladocerans and the ecological implications. *Environmental Pollution* **143**: 513–518.
- Guo, N., and P. Xie. 2011. A study on the effects of food quantity and quality on glutathione S-transferase (GST) activity and growth rate parameters of *Daphnia carinata* varying in age. *Aquatic Ecology* **45**: 63–73.
- Gustafsson, S., and L.-A. Hansson. 2004. Development of tolerance against toxic cyanobacteria in *Daphnia*. *Aquatic Ecology* **38**: 37–44.
- Hairston, N. G., W. Lampert, C. E. Caceres, C. L. Holtmeier, L. Weider, U. Gaedke, J. M. Fisher, J. A. Fox, and D. M. Post. 1999. Rapid evolution revealed by dormant eggs. *Nature* **401**: 446.
- Hansson, L. A., S. Gustafsson, K. Rengefors, and L. Bomark. 2007. Cyanobacterial chemical warfare affects zooplankton community composition. *Freshwater Biology* **52**: 1290–1301.
- Havens, K. E. 2008. Chapter 33: Cyanobacteria blooms: effects on aquatic ecosystems. *Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs Advances in Experimental Medicine and Biology* **619**: 733–747.
- Hays, G. C. 2003. A review of the adaptive significance and ecosystem consequences of zooplankton diel vertical migrations. *Hydrobiologia* **503**: 163–170.
- He, J., J. Chen, P. Xie, D. Zhang, G. Li, L. Wu, W. Zhang, X. Guo, and S. Li. 2012. Quantitatively evaluating detoxification of the hepatotoxic microcystins through the glutathione and cysteine pathway in the cyanobacteria-eating bighead carp. *Aquatic toxicology* **116-117C**: 61–68.
- Heisler, J., P. M. Glibert, J. M. Burkholder, D. M. Anderson, W. Cochlan, W. C. Dennison, Q. Dortch, C. J. Gobler, C. A. Heil, E. Humphries, A. Lewitus, R. Magnien, H. G. Marshall, K. Sellner, D. A. Stockwell, D. K. Stoecker, and M. Suddleson. 2008. Eutrophication and harmful algal blooms: A scientific consensus. *Harmful Algae* **8**: 3–13.
- Hoffmann, L., J. Komárek, and J. Kaštovský. 2005. System of cyanoprokaryotes (cyanobacteria) - state in 2004. *Algological Studies* **117**: 95-115.
- Honkanen, R. E., B. A. Codispoti, K. Tse, A. L. Boynton, and R. E. Honkanen. 1994. Characterization of natural toxins with inhibitory activity against serine/threonine protein phosphatases. *Toxicon* **32**: 339–50.

- Huynh-Delerme, C., M. Edery, H. Huet, S. Puiseux-Dao, C. Bernard, J. J. Fontaine, F. Crespeau, and A. de Luze. 2005. Microcystin-LR and embryo–larval development of medaka fish, *Oryzias latipes*. I. Effects on the digestive tract and associated systems.
- Ibelings, B. W., K. Bruning, J. De Jonge, K. Wolfstein, L. M. . Pires, J. Postma, and T. Burger. 2005. Distribution of microcystins in a lake foodweb: no evidence for biomagnification. *Microbial Ecology* **49**: 487–500.
- Irvine, K. 1997. Food selectivity and diel vertical distribution of *Chaoborus edulis* (Diptera , Chaoboridae) in Lake Malawi. *Freshwater Biology* **37**: 605–620.
- Jacquet, C., V. Thermes, A. de Luze, S. Puiseux-Dao, C. Bernard, J.-S. Joly, F. Bourrat, and M. Edery. 2004. Effects of microcystin-LR on development of medaka fish embryos (*Oryzias latipes*). *Toxicon* **43**: 141–147.
- Jacquet, S., J.-F. Briand, C. Leboulanger, C. Avois-Jacquet, L. Oberhaus, B. Tassin, B. Vinçon-Leite, G. Paolini, J.-C. Druart, O. Anneville, and J.-F. Humbert. 2005. The proliferation of the toxic cyanobacterium *Planktothrix rubescens* following restoration of the largest natural French lake (Lac du Bourget). *Harmful Algae* **4**: 651–672.
- Jacquet, S., F. Rimet, C. Girel, M. Perga, G. Paolini, J. Lazzarotto, I. Domaizon, J.-F. Humbert, P. Perney, L. Laine et F. Kerrien. 2010. Suivi scientifique de la qualité des eaux du lac du Bourget pour l’année 2009. Rapport 2009, 186 pages.
- Jacquet S., F. Rimet, M. E. Perga, G. Paolini, F. Kerrien, C. Girel, S. Cachera, J. Lazzarotto, P. Perney, L. Laine, B. Sotton, and D. Barbet. 2010. Suivi environnemental des eaux du lac du Bourget pour l’année 2010, INRA-Cisalb-CALB.
- Jang, M.-H., K. Ha, G.-J. Joo, and N. Takamura. 2003. Toxin production of cyanobacteria is increased by exposure to zooplankton. *Freshwater Biology* **48**: 1540–1550.
- Jang, M.-H., K. Ha, M. C. Lucas, G.-J. Joo, and N. Takamura. 2004. Changes in microcystin production by *Microcystis aeruginosa* exposed to phytoplanktivorous and omnivorous fish. *Aquatic Toxicology* **68**: 51–59.
- Jang, M.-H., K. Ha, and N. Takamura. 2008. Microcystin production by *Microcystis aeruginosa* exposed to different stages of herbivorous zooplankton. *Toxicon* **51**: 882–889.
- Jann-Para, G., I. Schwob, and M. Feuillade. 2004. Occurrence of toxic *Planktothrix rubescens* blooms in lake Nantua, France. *Toxicon* **43**: 279–285.
- Jewel, M. A. S., M. A. Affan, and S. Khan. 2003. Fish mortality due to cyanobacterial bloom in an aquaculture pond in Bangladesh. *Pakistan Journal of Biological Sciences* **6**: 1046–1050.

- Jiang, J., X. Gu, R. Song, Q. Zhang, J. Geng, X. Wang, and L. Yang. 2011. Time-dependent oxidative stress and histopathological changes in *Cyprinus carpio* L. exposed to microcystin-LR. *Ecotoxicology* **20**: 1000-1009.
- Jiang, J., Y. Shi, Z. Shan, L. Yang, X. Wang, and L. Shi. 2012. Bioaccumulation, oxidative stress and HSP70 expression in *Cyprinus carpio* L. exposed to microcystin-LR under laboratory conditions. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology* **155**: 483–90.
- Jonasson, S., J. Eriksson, L. Berntzon, U. Rasmussen, and B. Bergman. 2008. A novel cyanobacterial toxin (BMAA) with potential neurodegenerative effects. *Plant Biotechnology* **25**: 227–232.
- Jos, Á., S. Pichardo, A. I. Prieto, G. Repetto, C. M. Vázquez, I. Moreno, and A. M. Cameán. 2005. Toxic cyanobacterial cells containing microcystins induce oxidative stress in exposed tilapia fish (*Oreochromis sp.*) under laboratory conditions. *Aquatic Toxicology* **72**: 261–271.
- Kaebernick, M., T. Rohrlack, K. Christoffersen, and B. A. Neilan. 2001. A spontaneous mutant of microcystin biosynthesis: genetic characterization and effect on *Daphnia*. *Environmental Microbiology* **3**: 669–679.
- Keil, C., A. Forchert, J. Fastner, U. Szewzyk, W. Rotard, I. Chorus, and R. Krätke. 2002. Toxicity and microcystin content of extracts from a *Planktothrix* bloom and two laboratory strains. *Water Research* **36**: 2133–2139.
- de Kluijver, A., J. Yu, M. Houtekamer, J. J. Middelburg, and Z. Liu. 2012. Cyanobacteria as a carbon source for zooplankton in eutrophic Lake Taihu, China, measured by <sup>13</sup>C labeling and fatty acid biomarkers. *Limnology and Oceanography* **57**: 1245–1254.
- Kondo, F., Y. Ikai, H. Oka, M. Okumura, N. Ishikawa, K. Harada, K. Matsuura, H. Murata, and M. Suzuki. 1992. Formation, characterization, and toxicity of the glutathione and cysteine conjugates of toxic heptapeptide microcystins. *Chemical Research in Toxicology* **5**: 591–596.
- Kopp, R., and J. Hetesa. 2000. Changes of haematological indices of juvenile carp (*Cyprinus carpio* L.) under the influence of natural populations of cyanobacterial water blooms. *Acta Veterinaria Brno* **69**: 131–137.
- Kotak, B. G., R. . Zurawell, E. E. Prepas, and C. F. B. Holmes. 1996. Microcystin-LR concentration in aquatic food web compartments from lakes of varying trophic status. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **53**: 1974–1985.
- Kozlowsky-Suzuki, B., A. E. Wilson, and A. da S. F. Filho. 2012. Biomagnification or biodilution of microcystins in aquatic foodwebs? Meta-analyses of laboratory and field studies. *Harmful Algae* **18**: 47–55.

- Kumar, K., R. A. Mella-Herrera, and J. W. Golden. 2010. Cyanobacterial heterocysts. Cold Spring Harbor perspectives in biology **2**: 1-19.
- Kurmayer, R., G. Christiansen, J. Fastner, and T. Börner. 2004. Abundance of active and inactive microcystin genotypes in populations of the toxic cyanobacterium *Planktothrix* sp. Environmental Microbiology **6**: 831–841.
- Kurmayer, R., and F. Jüttner. 1999. Strategies for the co-existence of zooplankton with the toxic cyanobacterium *Planktothrix rubescens* in Lake Zurich. Journal of Plankton Research **21**: 659-683.
- Kurmayer, R., E. Schober, L. Tonk, P. M. Visser, and G. Christiansen. 2011. Spatial divergence in the proportions of genes encoding toxic peptide synthesis among populations of the cyanobacterium *Planktothrix* in European lakes. FEMS Microbiology Letters **317**: 127–137.
- Lampert, W. 1987. Laboratory studies on zooplankton-cyanobacteria interactions. New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research **21**: 483–490.
- Laurén-Määttä, C., J. Hietala, M. Reinikainen, and M. Walls. 1995. Do *Microcystis aeruginosa* toxins accumulate in the foodweb: a laboratory study. Hydrobiologia **304**: 23–27.
- Legnani, E., D. Copetti, A. Oggioni, G. Tartari, M. T. Palumbo, and G. Morabito. 2005. *Planktothrix rubescens*’ seasonal dynamics and vertical distribution in Lake Pusiano (North Italy). Journal of Limnology **64**: 61.
- Li, G., P. Xie, J. Fu, L. Hao, Q. Xiong, and H. Li. 2008. Microcystin-induced variations in transcription of GSTs in an omnivorous freshwater fish, goldfish. Aquatic toxicology **88**: 75–80.
- Li, L., and P. Xie. 2009. Hepatic Histopathological Characteristics and Antioxidant Response of Phytoplanktivorous Silver Carp Intraperitoneally Injected with Extracted Microcystins. Biomedical and Environmental Sciences **22**: 297–302.
- Li, L., P. Xie, and J. Chen. 2007a. Biochemical and ultrastructural changes of the liver and kidney of the phytoplanktivorous silver carp feeding naturally on toxic *Microcystis* blooms in Taihu Lake, China. Toxicon **49**: 1042–1053.
- Li, L., P. Xie, and L. Guo. 2010. Antioxidant response in liver of the phytoplanktivorous bighead carp (*Aristichthys nobilis*) intraperitoneally-injected with extracted microcystins. Fish Physiology and Biochemistry **36**: 165–172.
- Li, L., P. Xie, S. Li, T. Qiu, and L. Guo. 2007b. Sequential ultrastructural and biochemical changes induced in vivo by the hepatotoxic microcystins in liver of the phytoplanktivorous silver carp *Hypophthalmichthys molitrix*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology **146**: 357–367.



- Li, X., Y. Liu, L. Song, and J. Liu. 2003. Responses of antioxidant systems in the hepatocytes of common carp (*Cyprinus carpio* L.) to the toxicity of microcystin-LR. *Toxicon* **42**: 85–89.
- Li, X.-Y., I.-K. Chung, J.-I. Kim, and J.-A. Lee. 2004. Subchronic oral toxicity of microcystin in common carp (*Cyprinus carpio* L.) exposed to *Microcystis* under laboratory conditions. *Toxicon* **44**: 821–827.
- Liang, X., G. Li, S. He, and Y. Huang. 2007. Transcriptional responses of alpha- and rho-class glutathione S-transferase genes in the liver of three freshwater fishes intraperitoneally injected with microcystin-LR: Relationship of inducible expression and tolerance. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* **21**: 289–298.
- Liu, Y., L. Song, X. Li, and T. Liu. 2002. The toxic effects of microcystin-LR on embryo-larval and juvenile development of loach, *Misguruns mizolepis* Gunthe. *Toxicon* **40**: 395–399.
- Looper, R. E., M. T. C. Runnegar, and R. M. Williams. 2005. Synthesis of the putative structure of 7-deoxycylindrospermopsin: C7 oxygenation is not required for the inhibition of protein synthesis. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **44**: 3879–81.
- Lubzens, E., J. Cerdà, and M. Clark. 2010. Dormancy and Resistance in Harsh Environments. E. Lubzens, J. Cerda, and M. Clark [eds.]. Springer Berlin Heidelberg.
- Lüring, M. 2003. *Daphnia* growth on microcystin-producing and microcystin-free *Microcystis aeruginosa* in different mixtures with the green alga *Scenedesmus obliquus*. *Limnology and Oceanography* **48**: 2214–2220.
- Magalhães, V. F., M. M. Marinho, P. Domingos, A. C. Oliveira, S. M. Costa, L. O. Azevedo, and S. M. F. O. Azevedo. 2003. Microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) bioaccumulation in fish and crustaceans from Sepetiba Bay (Brasil, RJ). *Toxicon* **42**: 289–295.
- Magalhães, V. F., R. Moraes Soares, and S. M. F. O. Azevedo. 2001. Microcystin contamination in fish from the Jacarepaguá Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): ecological implication and human health risk. *Toxicon* **39**: 1077–1085.
- Makino, W., H. Haruna, and S. Ban. 1996. Diel vertical migration and feeding rhythm of *Daphnia longispina* and *Bosmina coregoni* in Lake Toya, Hokkaido, Japan. *Hydrobiologia* **337**: 133–143.
- Malbrouck, C., and P. Kestemont. 2006. Effects of microcystins on fish. *Environmental Toxicology and Chemistry* **25**: 72–86.
- Malbrouck, C., G. Trausch, P. Devos, and P. Kestemont. 2003. Hepatic accumulation and effects of microcystin-LR on juvenile goldfish *Carassius auratus* L. *Comparative Biochemistry and Physiology- Part C*. **135**: 39–48.

- Malbrouck, C., G. Trausch, P. Devos, and P. Kestemont. 2004. Effect of microcystin-LR on protein phosphatase activity in fed and fasted juvenile goldfish *Carassius auratus* L. *Toxicon* **43**: 295–301.
- Marie, B., H. Huet, A. Marie, C. Djediat, S. Puiseux-Dao, A. Catherine, I. Trinchet, and M. Edery. 2012. Effects of a toxic cyanobacterial bloom (*Planktothrix agardhii*) on fish: Insights from histopathological and quantitative proteomic assessments following the oral exposure of medaka fish (*Oryzias latipes*). *Aquatic toxicology* **114-115C**: 39–48.
- Marsac, N. T. de, and J. Houmard. 1988. Complementary chromatic adaptation: Physiological conditions and action spectra. *Methods in Enzymology* **167**: 318–328.
- Martins, J., and V. Vasconcelos. 2009. Microcystin Dynamics in Aquatic Organisms. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part B-Critical Reviews* **12**: 65–82.
- Masclaux, H., A. Bec, and G. Bourdier. 2012. Trophic partitioning among three littoral microcrustaceans: relative importance of periphyton as food resource. *Journal of Limnology* **71**: 261–266.
- Masson, S., N. Angeli, J. Guillard, and B. Pinel-Alloul. 2001. Diel vertical and horizontal distribution of crustacean zooplankton and young of the year fish in a sub-alpine lake: an approach based on high frequency sampling. *Journal of Plankton Research* **23**: 1041–1060.
- Mastin, B. J., J. Rodgers, and T. L. Deardorff. 2002. Risk evaluation of cyanobacteria-dominated algal blooms in a North Louisiana reservoir. *Journal of Aquatic Ecosystem Health* **9**: 103–114.
- McElhiney, J., and L. A. Lawton. 2005. Detection of the cyanobacterial hepatotoxins microcystins. *Toxicology and Applied Pharmacology* **203**: 219–230.
- McNeill, J., F. Barrie, H. Burdet, V. Demoulin, D. Hawksworth, K. Marhold, D. Nicolson, J. Prado, P. Silva, J. Skog, J. Wiersema, and N. Turland. 2006. International code of botanical nomenclature (Vienna code). *Regnum Vegetabile* 146 A.R.G Gantner Verlag KG.
- Mehner, T., S. Busch, I. P. Helland, M. Emmrich, and J. Freyhof. 2010. Temperature-related nocturnal vertical segregation of coexisting coregonids. *Ecology of Freshwater Fish* **19**: 408–419.
- Messineo, V., D. Mattei, S. Melchiorre, G. Salvatore, S. Bogialli, R. Salzano, R. Mazza, G. Capelli, and M. Bruno. 2006. Microcystin diversity in a *Planktothrix rubescens* population from Lake Albano (Central Italy). *Toxicon* **48**: 160–174.
- Micheletti, S., F. Schanz, and A. E. Walsby. 1998. The daily integral of photosynthesis by *Planktothrix rubescens* during summer stratification and autumnal mixing in Lake Zürich. *New Phytologist* **139**: 233–246.

- Mikhailov, A., A.-S. Härmälä-Braskén, J. Hellman, J. Meriluoto, and J. E. Eriksson. 2003. Identification of ATP-synthase as a novel intracellular target for microcystin-LR. *Chemico-Biological Interactions* **142**: 223–237.
- Mohamed, Z. A. 2001. Accumulation of Cyanobacterial Hepatotoxins by *Daphnia* in Some Egyptian Irrigation Canals. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **50**: 4–8.
- Murch, S. J., P. a Cox, S. a Banack, J. C. Steele, and O. W. Sacks. 2004. Occurrence of beta-methylamino-l-alanine (BMAA) in ALS/PDC patients from Guam. *Acta neurologica Scandinavica* **110**: 267–9.
- Naselli-Flores, L., J. Padisák, and M. Albay. 2007. Shape and size in phytoplankton ecology: do they matter? *Hydrobiologia* **578**: 157–161.
- Neffling, M.-R., E. Lance, and J. Meriluoto. 2010. Detection of free and covalently bound microcystins in animal tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Environmental Pollution* **158**: 948–52.
- Oberemm, A., J. Becker, G. A. Codd, and C. Steinberg. 1999. Effects of cyanobacterial toxins and aqueous crude extracts of cyanobacteria on the development of fish and amphibians. *Environmental Toxicology* **14**: 77–88.
- Oberhaus, L., J. F. Briand, C. Leboulanger, S. Jacquet, and J. F. Humbert. 2007a. Comparative effects of the quality and quantity of light and temperature on the growth of *Planktothrix agardhii* and *P. rubescens*. *Journal of Phycology* **43**: 1191–1199.
- Oberhaus, L., M. Gélinas, B. Pinel-Alloul, A. Ghadouani, and J. F. Humbert. 2007b. Grazing of two toxic *Planktothrix* species by *Daphnia pulicaria*: potential for bloom control and transfer of microcystins. *Journal of Plankton Research* **29**: 827–838.
- Oh, H., S. J. Lee, M. Jang, and B. Yoon. 2000. Microcystin Production by *Microcystis aeruginosa* in a Phosphorus-limited Chemostat. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 176–179.
- Van der Oost, R., J. Beyer, and N. P. E. Vermeulen. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **13**: 57–149.
- Oren, A., and B. J. Tindall. 2005. Nomenclature of the cyanophyta/cyanobacteria/cyanoprokaryotes under the International Code of Nomenclature of Prokaryotes. *Algological Studies* **117**: 39-52
- Ortiz-Rodríguez, R., and C. Wiegand. 2010. Age related acute effects of microcystin-LR on *Daphnia magna* biotransformation and oxidative stress. *Toxicon* **56**: 1342–1349.

- Ostermaier, V., and R. Kurmayer. 2009. Distribution and abundance of nontoxic mutants of cyanobacteria in lakes of the Alps. *Microbial ecology* **58**: 323–33.
- Ostermaier, V., and R. Kurmayer. 2010. Application of Real-Time PCR to Estimate Toxin Production by the Cyanobacterium *Planktothrix* sp. *Applied and Environmental Microbiology* **76**: 3495.
- Ozawa, K., H. Fujioka, M. Muranaka, A. Yokoyama, Y. Katagami, T. Homma, K. Ishikawa, S. Tsujimura, M. Kumagai, M. F. Watanabe, and H.-D. Park. 2005. Spatial distribution and temporal variation of *Microcystis* species composition and microcystin concentration in Lake Biwa. *Environmental toxicology* **20**: 270–6, doi:10.1002/tox.20117
- O’Neil, J. M., T. W. Davis, M. A. Burford, and C. J. Gobler. 2012. The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change. *Harmful Algae* **14**: 313–334.
- Pablo, J., S. a Banack, P. a Cox, T. E. Johnson, S. Papapetropoulos, W. G. Bradley, a Buck, and D. C. Mash. 2009. Cyanobacterial neurotoxin BMAA in ALS and Alzheimer’s disease. *Acta neurologica Scandinavica* **120**: 216–25.
- Paerl, H. W., R. S. Fulton, P. H. Moisander, and J. Dyble. 2001. Harmful freshwater algal blooms, with an emphasis on cyanobacteria. *TheScientificWorldJournal* **1**: 76–113.
- Paerl, H. W., and J. Huisman. 2009. Climate change: a catalyst for global expansion of harmful cyanobacterial blooms. *Environmental Microbiology Reports* **1**: 27–37.
- Paerl, H. W., and V. J. Paul. 2011. Climate Change: Links to Global Expansion of Harmful Cyanobacteria. *Water Research* **46**: 1363–1349.
- Paerl, H. W., and J. F. Ustach. 1982. Blue-green algal scums: An explanation for their occurrence during freshwater blooms. *Limnology and Oceanography* **27**: 212–217.
- Palikova, M., J. Mares, R. Kopp, J. Hlavkova, S. Navratil, O. Adamovsky, L. Chmelar, and L. Blaha. 2011. Accumulation of Microcystins in Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* L., and Effects of a Complex Cyanobacterial Bloom on the Dietetic Quality of Muscles. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **87**: 26–30.
- Palinska, K. A. 2008). *Cyanobacteria*. Eds. John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- Papadimitriou, T., I. Kagalogou, V. Bacopoulos, and I. Leonardos. 2010. Accumulation of Microcystins in Water and Fish Tissues: An Estimation of Risks Associated with Microcystins in Most of the Greek Lakes. *Environmental Toxicology* **25**: 418–427.
- Park, H., C. Iwami, M. F. Watanabe, K. Harada, and T. Okino. 1998. Temporal Variabilities of the Concentrations of Intra- and Extracellular Microcystin and Toxic *Microcystis* Species in a

- Hypertrophic Lake , Lake Suwa, Japan (1991-1994). *Environmental Toxicology and Water Quality* **13**: 61–72.
- Parmar, A., N. K. Singh, A. Pandey, E. Gnansounou, and D. Madamwar. 2011. Cyanobacteria and microalgae: a positive prospect for biofuels. *Bioresource technology* **102**: 10163–10172.
- Paulino, S., E. Valério, N. Faria, J. Fastner, M. Welker, R. Tenreiro, and P. Pereira. 2009. Detection of *Planktothrix rubescens* (Cyanobacteria) associated with microcystin production in a freshwater reservoir. *Hydrobiologia* **621**: 207–211.
- Pavagadhi, S., Z. Gong, M. P. Hande, D. D. Dionysiou, A. A. de la Cruz, and R. Balasubramanian. 2012. Biochemical response of diverse organs in adult *Danio rerio* (zebrafish) exposed to sub-lethal concentrations of microcystin-LR and microcystin-RR: A balneation study. *Aquatic Toxicology* **109**: 1–10
- Pearson, L., T. Mihali, M. Moffit, R. Kellmann, and B. Neilan. 2010. On the Chemistry , Toxicology and Genetics of the cyanobacterial toxins, Microcystin, Nodularin, Saxitoxin and Cylindrospermopsin. *Marine Drugs* **8**: 1650–1680.
- Perga, M.E., I. Domaizon, J. Guillard, V. Hamelet and O. Anneville. 2012. Are cyanobacterial blooms trophic dead-ends?. *Oecologia* In press.
- Pflugmacher, S., C. Wiegand, A. Oberemm, K. A. Beattie, E. Krause, G. A. Codd, and C. E. W. Steinberg. 1998. Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: the first step of detoxication. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1425**: 527–533.
- Pietsch, C., C. Wiegand, M. V. Amé, A. Nicklisch, D. Wunderlin, and S. Pflugmacher. 2001. The effects of a cyanobacterial crude extract on different aquatic organisms: Evidence for cyanobacterial toxin modulating factors. *Environmental toxicology* **16**: 535–542.
- Ponton, D., and D. Gerdeaux. 1988. Quelques aspects de l'alimentation de deux poissons planctonophages du Lac Léman: le Corégone (*Coregonus schinzii palea* Cuv. et Val.) et le gardon (*Rutilus rutilus* L.). *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* **308**: 11–23.
- Porter, K. G., and J. D. Orcutt. 1980. Nutritional adequacy, man-ageability, and toxicity as factors that determine the food quality of green and blue-green algae for *Daphnia*. *Special Symposia - American Society of Limnology and Oceanography* **3**: 268–280.
- Prieto, A. I., A. Jos, S. Pichardo, I. Moreno, M. Á. de Sotomayor, R. Moyano, A. Blanco, and A. M. Cameán. 2009. Time-dependent protective efficacy of Trolox (vitamin E analog) against microcystin-induced toxicity in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Environmental Toxicology* **24**: 563–579.
- Prieto, A. I., S. Pichardo, Á. Jos, I. Moreno, and A. M. Cameán. 2007. Time-dependent oxidative stress responses after acute exposure to toxic cyanobacterial cells containing microcystins in

- tilapia fish (*Oreochromis niloticus*) under laboratory conditions. *Aquatic Toxicology* **84**: 337–345.
- Prieto, A., A. Jos, S. Pichardo, I. Moreno, and A. Camean. 2006. Differential oxidative stress responses to microcystins LR and RR in intraperitoneally exposed tilapia fish (*Oreochromis sp.*). *Aquatic Toxicology* **77**: 314–321.
- Probst, W. N., and R. Eckmann. 2009. Diet overlap between young-of-the-year perch, *Perca fluviatilis* L., and burbot, *Lota lota* L., during early life-history stages. *Ecology of Freshwater Fish* **18**: 527–536.
- Qiu, T., P. Xie, Z. Ke, L. Li, and L. Guo. 2007. In situ studies on physiological and biochemical responses of four fishes with different trophic levels to toxic cyanobacterial blooms in a large Chinese lake. *Toxicon* **50**: 365–376.
- Rantala, A., D. P. Fewer, M. Hisbergues, L. Rouhiainen, J. Vaitomaa, T. Börner, and K. Sivonen. 2004. Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 568–73.
- Ravet, J. L., and M. T. Brett. 2006. Phytoplankton essential fatty acid and phosphorus content constraints on *Daphnia* somatic growth and reproduction. *Limnology and Oceanography* **51**: 2438–2452.
- Rohrlack, T., K. Christoffersen, E. Dittmann, I. Nogueira, V. Vasconcelos, and T. Börner. 2005a. Ingestion of Microcystins by *Daphnia*: Intestinal Uptake and Toxic Effects. *Limnology and Oceanography* **50**: 440–448.
- Rohrlack, T., K. Christoffersen, and U. Friberg-Jensen. 2005b. Frequency of inhibitors of daphnid trypsin in the widely distributed cyanobacterial genus *Planktothrix*. *Environmental Microbiology* **7**: 1667–1669.
- Rohrlack, T., E. Dittmann, T. Borner, and K. Christoffersen. 2001. Effects of Cell-Bound Microcystins on Survival and Feeding of *Daphnia sp.* *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 3523–3529.
- Romo, S., F. Fernández, Y. Ouahid, and Á. Barón-Sola. 2011. Assessment of microcystins in lake water and fish (Mugilidae, *Liza sp.*) in the largest Spanish coastal lake. *Environmental Monitoring and Assessment* **184**: 939–949.
- Råbergh, C. M. I., G. Bylund, and J. E. Eriksson. 1991. Histopathological effects of microcystin-LR, a cyclic peptide toxin from the cyanobacterium (blue-green alga) *Microcystis aeruginosa* on common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquatic Toxicology* **20**: 131–145.
- Salmaso, N. 2010. Long-term phytoplankton community changes in a deep subalpine lake: responses to nutrient availability and climatic fluctuations. *Freshwater Biology* **55**: 825–846.

- Setlikova, I., and C. Wiegand. 2009. Hepatic and branchial glutathione S-transferases of two fish species: Substrate specificity and biotransformation of microcystin-LR. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* **149**: 515–523.
- Singh, S., B. N. Kate, and U. C. Banerjee. 2005. Bioactive Compounds from Cyanobacteria and Microalgae: An Overview. *Critical Reviews In Biotechnology* **25**: 73–95.
- Smith, J. L., and J. F. Haney. 2006. Foodweb transfer, accumulation, and depuration of microcystins, a cyanobacterial toxin, in pumpkinseed sunfish (*Lepomis gibbosus*). *Toxicon* **48**: 580–589.
- Smith, V. H., and D. W. Schindler. 2009. Eutrophication science: where do we go from here? *Trends in ecology & evolution* **24**: 201–7.
- Soares, R. M., V. F. Magalhães, and S. M. F. O. Azevedo. 2004. Accumulation and depuration of microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) in *Tilapia rendalli* (Cichlidae) under laboratory conditions. *Aquatic Toxicology* **70**: 1–10.
- Sommaruga, R., Y. Chen, and Z. Liu. 2009. Multiple strategies of bloom-forming *Microcystis* to minimize damage by solar ultraviolet radiation in surface waters. *Microbial ecology* **57**: 667–74.
- Stanier, R. Y., and G. Cohen-Bazire. 1977. Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. *Annual review of microbiology* **31**: 225–74.
- Stanier, R. Y., W. R. Sistrom, T. A. Hansen, B. A. Whitton, R. W. Castenholz, N. Pfennig, V. N. Gorlenko, E. N. Kondratieva, K. E. Eimhjellen, R. Whittenbury, R. L. Gherna, and H. G. Truper. 1978. Proposal to Place the Nomenclature of the Cyanobacteria (Blue-Green Algae) Under the Rules of the International Code of Nomenclature of Bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology* **28**: 335–336.
- Swift, M. C. 1992. Prey capture by the four larval instars of *Chaoborus crystallinus*. *Limnology and Oceanography* **37**: 14–24.
- Sønstebo, J. H., and T. Rohrlack. 2011. Possible implications of chytrid parasitism for population subdivision in freshwater cyanobacteria of the genus *Planktothrix*. *Applied and Environmental Microbiology* **77**: 1344–51.
- Tencalla, F., and D. Dietrich. 1997. Biochemical characterization of microcystin toxicity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicon* **35**: 583–595.
- Tillmanns, A. R., A. E. Wilson, F. R. Pick, and O. Sarnelle. 2008. Meta-analysis of cyanobacterial effects on zooplankton population growth rate: species-specific responses. *Archiv für Hydrobiologie* **171**: 285–295.

- Trinchet, I., C. Djediat, H. Huet, S. P. Dao, and M. Edery. 2011. Pathological modifications following sub-chronic exposure of medaka fish (*Oryzias latipes*) to microcystin-LR. *Reproductive Toxicology* **32**: 329–40.
- Van Apeldoorn, M. E., H. P. Van Egmond, G. J. A. Speijers, and G. J. I. Bakker. 2007. Toxins of cyanobacteria. *Molecular Nutrition & Food Research* **51**: 7–60.
- Van den Wyngaert, S., M. M. Salcher, J. Pernthaler, M. Zeder, and T. Posch. 2011. Quantitative dominance of seasonally persistent filamentous cyanobacteria (*Planktothrix rubescens*) in the microbial assemblages of a temperate lake. *Limnology and Oceanography* **56**: 97–109.
- Vareli, K., E. Briasoulis, G. Pilidis, and I. Sainis. 2009. Molecular confirmation of *Planktothrix rubescens* as the cause of intense, microcystin--Synthesizing cyanobacterial bloom in Lake Ziros, Greece. *Harmful Algae* **8**: 447–453.
- Vasconcelos, V. 2001. Cyanobacteria toxins: diversity and ecological effects. *Limnetica* **20**: 45–58.
- Viaggiu, E., S. Melchiorre, F. Volpi, A. Di Corcia, R. Mancini, L. Garibaldi, G. Crichigno, and M. Bruno. 2004. Anatoxin-a toxin in the cyanobacterium *Planktothrix rubescens* from a fishing pond in northern Italy. *Environmental Toxicology* **19**: 191–197.
- Von Elert, E., D. Martin-Creuzburg, and J. R. Le Coz. 2003. Absence of sterols constrains carbon transfer between cyanobacteria and a freshwater herbivore (*Daphnia galeata*). *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society* **270**: 1209–14.
- Von Elert, E., and T. Wolffrom. 2001. Supplementation of cyanobacterial food with polyunsaturated fatty acids does not improve growth of *Daphnia*. *Limnology and oceanography* **46**: 1552–1558.
- Von Ende, C., and D. O. Dempsey. 1981. Apparent exclusion of the Cladoceran *Bosmina longirostris* by invertebrate predator *Chaoborus americanus*. *American Midland Naturalist* **105**: 240–248.
- Walsby, A. E. 2005. Stratification by cyanobacteria in lakes: a dynamic buoyancy model indicates size limitations met by *Planktothrix rubescens* filaments. *New Phytologist* **168**: 365–376.
- Walsby, A. E., A. Avery, and F. Schanz. 1998. The critical pressures of gas vesicles in *Planktothrix rubescens* in relation to the depth of winter mixing in Lake Zurich, Switzerland. *Journal of Plankton Research* **20**: 1357–1375.
- Walsby, A. E., Z. Dubinsky, J. C. Kromkamp, C. Lehmann, and F. Schanz. 2001. The effects of diel changes in photosynthetic coefficients and depth of *Planktothrix rubescens* on the daily integral of photosynthesis in Lake Zürich. *Aquatic sciences* **63**: 326–349.



- Walsby, A. E., G. Ng, C. Dunn, and P. a. Davis. 2004. Comparison of the depth where *Planktothrix rubescens* stratifies and the depth where the daily insolation supports its neutral buoyancy. *New Phytologist* **162**: 133–145.
- Walsby, A. E., F. Schanz, and M. Schmid. 2006. The Burgundy-blood phenomenon: a model of buoyancy change explains autumnal waterblooms by *Planktothrix rubescens* in Lake Zürich. *New Phytologist* **169**: 109–22.
- Wang, N., and A. Appenzeller. 1998. Abundance , depth distribution , diet composition and growth of perch (*Perca fluviatilis*) and burbot (*Lota Ota*) larvae and juveniles in the pelagic-zone of Lake. *Ecology of Freshwater Fish* **7**: 176–183.
- Wang, N., and R. Eckmann. 1994. Distribution of perch (*Perca fluviatilis* L.) during their first year of life in Lake Constance. *Hydrobiologia* **277**: 135–143.
- Wang, P.-J., M.-S. Chien, F.-J. Wu, H.-N. Chou, and S.-J. Lee. 2005. Inhibition of embryonic development by microcystin-LR in zebrafish, *Danio Rerio*. *Toxicon* **45**: 303–308.
- Watanabe, M. M., K. Kaya, and N. Takamura. 1992. Fate of the toxic cyclic hepatpeptides, the Microcystins, from blooms of *Microcystis* (Cyanobacteria) in a hypertrophic lake. *Journal of Phycology* **28**: 761–767.
- Welker, M., and H. Von Döhren. 2006. Cyanobacterial peptides–nature’s own combinatorial biosynthesis. *FEMS Microbiology Review* **30**: 530–563.
- Whitton, B. A., and M. Potts. 2000. The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space. Eds. by B. A. Whitton & M. Potts.
- Wiedner, C., P. M. Visser, J. Fastner, J. S. Metcalf, G. A. Codd, and L. R. Mur. 2003. Effects of light on the microcystin content of *Microcystis* strain PCC 7806. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 1475–1481.
- Wiegand, C., and S. Pflugmacher. 2005. Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review. *Toxicology and Applied Pharmacology* **203**: 201–218.
- Wiegand, C., S. Pflugmacher, A. Oberemm, N. Meems, K. A. Beattie, C. E. W. Steinberg, and G. A. Codd. 1999. Uptake and effects of microcystin-LR on detoxication enzymes of early life stages of the zebra fish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology* **14**: 89–95.
- Williams, D. E., M. Craig, S. C. Dawe, M. L. Kent, R. J. Andersen, and C. F. B. Holmes. 1997a. <sup>14</sup>C-labelled microcystin-LR administered to Atlantic salmon via intraperitoneal injection provides in vivo evidence for covalent binding of microcystin-LR in salmon livers. *Toxicon* **35**: 985–989.

- Williams, D. E., M. Craig, S. C. Dawe, M. L. Kent, C. F. B. Holmes, and R. J. Andersen. 1997b. Evidence for a Covalently Bound Form of Microcystin-LR in Salmon Liver and Dungeness Crab Larvae. *Chemical Research in Toxicology* **10**: 463–469.
- Wilson, A. E., O. Sarnelle, and A. R. Tillmanns. 2006. Effects of cyanobacterial toxicity and morphology on the population growth of freshwater zooplankton: Meta-analyses of laboratory experiments. *Limnology and Oceanography* **51**: 1915–1924.
- Winfield, I. J. 1986. The influence of simulated aquatic macrophytes on the zooplankton consumption rate of juvenile roach, *Rutilus rutilus*, rudd, *Scardinius erythrophthalmus*, and perch, *Perca fluviatilis*. *Journal of Fish Biology* **29**: 37–48.
- Wood, S. A., L. R. Briggs, J. Sprosen, J. G. Ruck, R. G. Wear, P. T. Holland, and M. Bloxham. 2006. Changes in concentrations of microcystins in rainbow trout, freshwater mussels, and cyanobacteria in Lakes Rotoiti and Rotoehu. *Environmental toxicology* **21**: 205–22.
- Wood, S. A., A. Rueckert, D. P. Hamilton, S. C. Cary, and D. R. Dietrich. 2011. Switching toxin production on and off: intermittent microcystin synthesis in a *Microcystis* bloom. *Environmental Microbiology Reports* **3**: 118–124.
- Wu, Q., M. Li, X. Gao, J. P. Giesy, Y. Cui, L. Yang, and Z. Kong. 2011. Genotoxicity of crude extracts of cyanobacteria from Taihu Lake on carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicology* **20**: 1010–1017.
- Xie, L., P. Xie, L. Guo, L. Li, Y. Miyabara, and H.-D. Park. 2005. Organ distribution and bioaccumulation of microcystins in freshwater fish at different trophic levels from the eutrophic Lake Chaohu, China. *Environmental Toxicology* **20**: 293–300.
- Xie, L., P. Xie, K. Ozawa, T. Honma, A. Yokoyama, and H.-D. Park. 2004. Dynamics of microcystins-LR and -RR in the phytoplanktivorous silver carp in a sub-chronic toxicity experiment. *Environmental Pollution* **127**: 431–439.
- Xu, L., P. K. S. Lam, J. Chen, Y. Zhang, and K. Harada. 2000. Comparative study on in vitro inhibition of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) and mouse protein phosphatases by microcystins. *Environmental Toxicology* **15**: 71–75.
- Yang, G., B. Qin, X. Tang, Z. Gong, C. Zhong, H. Zou, and X. Wang. 2012. Contrasting zooplankton communities of two bays of the large, shallow, eutrophic Lake Taihu, China: Their relationship to environmental factors. *Journal of Great Lakes Research* **38**: 299–308.
- Yoshida, M., T. Yoshida, A. Kashima, Y. Takashima, N. Hosoda, K. Nagasaki, and S. Hiroishi. 2008. Ecological dynamics of the toxic bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* and its cyanophages in freshwater. *Applied and environmental microbiology* **74**: 3269–73.
- Zambrano, F., and E. Canelo. 1996. Effects of microcystin-LR on the partial reactions of the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pump of the gill of carp (*Cyprinus carpio* L.). *Toxicon* **34**: 451–8.

- Zegura, B., A. Straser, and M. Filipic. 2011. Genotoxicity and potential carcinogenicity of cyanobacterial toxins - a review. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* **727**: 16–41.
- Zhang, D., P. Xie, J. Chen, M. Dai, T. Qiu, Y. Liu, and G. Liang. 2009a. Determination of microcystin-LR and its metabolites in snail (*Bellamya aeruginosa*), shrimp (*Macrobrachium nipponensis*) and silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) from Lake Taihu, China. *Chemosphere* **76**: 974–981.
- Zhang, D., P. Xie, Y. Liu, and T. Qiu. 2009b. Transfer, distribution and bioaccumulation of microcystins in the aquatic food web in Lake Taihu, China, with potential risks to human health. *Science of the Total Environment* **407**: 2191–2199.
- Zhang, D., Q. Yang, P. Xie, X. Deng, J. Chen, and M. Dai. 2012a. The role of cysteine conjugation in the detoxification of microcystin-LR in liver of bighead carp (*Aristichthys nobilis*): a field and laboratory study. *Ecotoxicology* **21**: 244–252.
- Zhang, H., J. Zhang, Y. Chen, and Y. Zhu. 2007. Influence of intracellular Ca<sup>2+</sup>, mitochondria membrane potential, reactive oxygen species, and intracellular ATP on the mechanism of microcystin-LR induced apoptosis in *Carassius auratus* lymphocytes *in-vitro*. *Environmental Toxicology* **22**: 559–564.
- Zhang, J., Z. Wang, Z. Song, Z. Xie, L. Li, and L. Song. 2012b. Bioaccumulation of microcystins in two freshwater gastropods from a cyanobacteria-bloom plateau lake, Lake Dianchi. *Environmental pollution* **164**: 227–34.
- Zhao, Y., P. Xie, H. Fan, and S. Zhao. 2011. Impairment of the mitochondrial oxidative phosphorylation system and oxidative stress in liver of crucian carp (*Carassius auratus* L.) exposed to microcystins. *Environmental Toxicology* **26**: 472–479.